

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA-TOXICOLOGIA
Y ANALISIS QUIMICO APLICADO

"LA MIEL.- ALGUNOS PARAMETROS DE INTERES EN SU CONTROL
DE CALIDAD".

Memoria presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago para optar al Grado de Doctor por:

José Francisco Huidobro Canales.

Santiago, Abril de 1983.



Verificado el ejercicio del Grado de Doctor en la
Universidad de Santiago de Compostela, ante el tribunal
formado por los Profesores:

Presidente: Ilmo. Sr. Dr. D. José María Calleja Suárez.

Vocales: Dr. D. Jesús Simal Lozano

Dra. Dña. María del Carmen Martínez Para

Dra. Dña. María del Carmen López Martínez

Secretaria: Dra. Dña. María Asunción Lage Yusty

el día 20 de Junio de 1983, obtuvo la calificación de
SOBRESALIENTE "Cum laude".



JESUS SIMAL LOZANO, Catedrático y Director del Departamento de Bromatología-Toxicología y Análisis Químico Aplicado de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICO: Que la Tesis titulada "**La Miel.- Algunos parámetros de interés en su control de calidad**" presentada por el Licenciado en Farmacia D. JOSE FRANCISCO HUIDOBRO CANALES para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección en los laboratorios de este Departamento.

Y para que conste, expido la presente en Santiago de Compostela a treinta de Abril de mil novecientos ochenta y tres.

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA





Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor D. Jesús Simal Lozano por su constante orientación científica e inapreciable ayuda tanto en el planteamiento como en el desarrollo de la presente memoria.

A los Profesores José Maria Creus Vidal, Perfecto Paseiro Losada, Maria Asunción Lage Yusty y Julia López Hernández, así como a los demás compañeros de Laboratorio por las ayudas que en todo momento me han proporcionado.

Mi reconocimiento al Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia por la ayuda material prestada.

A mis amigos los Licenciados en Farmacia, D. Juan García Monteagudo y D. Benjamín Lois Salgado, por la elaboración del programa para el cálculo de determinación de color en la miel y la realización gráfica de las figuras de este trabajo, respectivamente.

Mi más sincera gratitud a D. Amador Rodríguez Troncoso, Regidor de Actividades para Galicia del Servicio de Extensión Agraria por habernos facilitado las muestras de miel de la región gallega de forma desinteresada así como la posibilidad de estar en comunicación mediante la Asociación Gallega de Apicultura con la problemática e inquietudes científicas de los apicultores.

A D. Antonio Barroso García por su paciente labor mecanográfica.





En recuerdo de mis abuelos,
y a mis padres.



INDICE

	<u>Pág.</u>
ABREVIATURAS	19
1.- INTRODUCCION	23
1.1.- COMENTARIO AL CONCEPTO Y LEGISLACION	25
1.2.- COMPOSICION Y PROPIEDADES	29
1.3.- EVOLUCION DE LA APICULTURA	32
1.3.1.- Colmena de bastidor movable y espacio para las abejas	32
1.3.2.- Desarrollo del equipo moderno ...	33
1.3.3.- La abeja	34
1.3.4.- La flora	34
1.3.5.- El clima	35
1.4.- PROCESADO	35
1.5.- PRODUCCION, COMERCIO MUNDIAL Y USOS	37
1.6.- CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARAMETROS SE- LECCIONADOS EN LA CALIDAD DE LA MIEL	40
1.6.1.- Color y turbidez	40
1.6.2.- Acidez (pH, acidez libre, lactó- nica y total) e índice de formol.	41
1.6.3.- Sustancias minerales	44
1.6.4.- Contenido en agua	46
1.6.5.- Azúcares	49
1.6.6.- Enzimas	51
1.6.7.- Hidroximetilfurfural	53
1.7.- CONSIDERACIONES SOBRE EL PROCESADO Y AL- MACENAMIENTO	54
1.8.- CONTROL DE CALIDAD	56
1.9.- OBJETO DEL TRABAJO	58

2.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DE LOS METODOS ANALITICOS	59
2.1.- COLOR Y TURBIDEZ	61
2.2.- ACIDEZ (pH, ACIDEZ LIBRE, LACTONICA Y TOTAL), E INDICE DE FORMOL	63
2.3.- CENIZAS	65
2.4.- CONTENIDO EN AGUA	65
2.4.1.- Métodos basados en la medida del índice de refracción	66
2.4.2.- Métodos basados en la determinación de la densidad	66
2.4.3.- Métodos gravimétricos	68
2.4.3.1.- Por desecación directa.	68
2.4.3.2.- Desecación a vacío y temperatura menor de 70°C	68
2.4.4.- Método de Karl-Fischer	69
2.5.- AZUCARES	69
2.5.1.- Métodos polarimétricos	69
2.5.2.- Métodos químicos reductométricos.	70
2.5.3.- Métodos gravimétricos para la determinación de dextrinas en la miel	71
2.5.4.- Métodos cromatográficos	71
2.5.5.- Métodos enzimáticos	73
2.5.6.- Otros métodos	73
2.6.- ENZIMAS	74
2.7.- HIDROXIMETILFURFURAL	76

3.- PARTE EXPERIMENTAL	79
3.1.- DETERMINACION DEL COLOR Y DE LA TURBIDEZ. 81	
3.1.1.- Método oficial en la A.O.A.C. ... 81	
3.1.1.1.- Fundamento	81
3.1.1.2.- Aparatos	81
3.1.1.3.- Procedimiento	82
3.1.2.- Método de Barbier y Valin 82	
3.1.2.1.- Fundamento	82
3.1.2.2.- Reactivos	83
3.1.2.3.- Procedimiento	83
3.1.3.- Método de J. Simal, J.F. Huidobro y J.L. Araquistain 83	
3.1.3.1.- Fundamento	84
3.1.3.2.- Reactivos	84
3.1.3.3.- Material y aparatos ...	84
3.1.3.4.- Procedimiento	85
3.1.4.- Aplicación del método de la "Commission Internationale de l'Eclairage" al color en la miel. 85	
3.1.4.1.- Fundamento	85
3.1.4.2.- Material y aparatos ...	86
3.1.4.3.- Procedimiento y cálculos	86
3.1.5.- Comentario a los métodos de determinación de color 88	

3.2.- DETERMINACION DE LA ACIDEZ (pH, ACIDEZ LIBRE, LACTONICA Y TOTAL) E INDICE DE FORMOL	99
3.2.1.- Fundamento	99
3.2.2.- Reactivos	100
3.2.3.- Material y aparatos	100
3.2.4.- Procedimiento	100
3.2.5.- Cálculos y expresión de resultados	101
3.2.6.- Precisión	101
3.3.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CENIZAS ..	103
3.3.1.- Fundamento	103
3.3.2.- Material y aparatos	103
3.3.3.- Procedimiento	103
3.3.4.- Cálculos y expresión de resultados	105
3.3.5.- Precisión	105
3.4.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN AGUA	105
3.5.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN AZUCARES..	107
3.5.1.- Azúcares reductores	108
3.5.1.1.- Fundamento	108
3.5.1.2.- Reactivos	108
3.5.1.3.- Material y aparatos ...	109
3.5.1.4.- Procedimiento	109
3.5.1.5.- Cálculos y expresión de resultados	109
3.5.1.6.- Precisión	109
3.5.2.- Determinación del contenido de glucosa y de fructosa	110
3.5.2.1.- Fundamento	110
3.5.2.2.- Reactivos	111
3.5.2.3.- Material y aparatos ...	111

3.5.2.4.- Procedimiento	112
3.5.2.5.- Cálculos y expresión de resultados	113
3.5.2.6.- Precisión	114
3.5.2.7.- Exactitud	118
 3.5.3.- Determinación del contenido apa- rente en maltosa	118
3.5.3.1.- Fundamento	118
3.5.3.2.- Reactivos	118
3.5.3.3.- Material y aparatos ...	119
3.5.3.4.- Cálculos y expresión de resultados	119
3.5.3.5.- Precisión y exactitud..	120
 3.5.4.- Determinación del contenido apa- rente en sacarosa	120
3.5.4.1.- Fundamento	120
3.5.4.2.- Reactivos	120
3.5.4.3.- Material y aparatos ...	120
3.5.4.4.- Procedimiento	121
3.5.4.5.- Cálculos y expresión de resultados	121
3.5.4.6.- Precisión	121
 3.5.5.- Determinación del contenido en dextrinas	121
3.5.5.1.- Fundamento	121
3.5.5.2.- Reactivos	122
3.5.5.3.- Material y aparatos ...	122
3.5.5.4.- Procedimiento	123
3.5.5.5.- Cálculos y expresión de resultados	124
3.5.5.6.- Precisión	124

3.6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DIASTASICA.	126
3.6.1.- Fundamento	126
3.6.2.- Reactivos	126
3.6.3.- Material y aparatos	127
3.6.4.- Procedimiento	127
3.6.5.- Cálculos y expresión de resulta- dos	127
3.6.6.- Precisión	128
3.7.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HIDROXIME TILFURFURAL	130
3.7.1.- Método oficial en España	131
3.7.1.1.- Fundamento	131
3.7.1.2.- Reactivos	131
3.7.1.3.- Material y aparatos ...	131
3.7.1.4.- Procedimiento	132
3.7.1.5.- Cálculos y expresión de resultados	132
3.7.1.6.- Precisión	132
3.7.1.7.- Exactitud	132
3.7.2.- Método oficial en la A.O.A.C. ...	135
3.7.2.1.- Fundamento	135
3.7.2.2.- Reactivos	135
3.7.2.3.- Material y aparatos ...	136
3.7.2.4.- Procedimiento	136
3.7.2.5.- Cálculos y expresión de resultados	137
3.7.2.6.- Precisión	137
3.7.2.7.- Exactitud	137

4.- MUESTRAS, RESULTADOS Y DISCUSION	143
4.1.- MUESTRAS	145
4.2.- RESULTADOS Y DISCUSION	145
5.- CONCLUSIONES	185
6.- REFERENCIAS	193





ABREVIATURAS

A	= absorbancia
a J.C.	= antes de Jesucristo
A.O.A.C.	= Association of Official Analytical Chemists
Art.	= artículo
ATP	= adenosin-5'-trifosfato
b	= espesor
B.O.E.	= Boletín Oficial del Estado
°C	= grados centígrados
C.A.E.	= Código Alimentario Español
C.I.E.	= Commission Internationale de l'Eclairage
cm	= centímetro
Cv%	= coeficiente de variación por ciento
d	= densidad
domin.	= dominante
EE.UU.	= Estados Unidos de América
F	= fructosa
F.A.O.	= Food and Agriculture Organization
F.E.	= Farmacopea Oficial Española
F6P	= fructosa-6-fosfato
Fig.	= figura
g	= gramo
G	= glucosa
GC	= cromatografía gaseosa
GLC	= cromatografía gas líquido
G6P	= glucosa-6-fosfato
G6PDH	= glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: D-glucosa-6-fosfato: NADP ⁺ 1-oxidoreductasa, E.C. 1.1.1.49.
J.A.O.A.C.	= Journal of the Association of Official Analytical Chemists
HK	= hexoquinasa: ATP: D-Hexosa 6-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.1.
H.M.F.	= hidroximetilfurfural
HPLC	= cromatografía líquida de alta resolución
I.C.N.N.D.	= Comité Interdepartamental de Nutrición para la Defensa Nacional

I.N.C.A.P.	= Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá
Kg	= kilogramo
l	= litro
log	= logaritmo
long.	= longitud
mg	= miligramo
meq	= miliequivalente
min	= minuto
ml	= mililitro
mm	= milímetro
N	= Normal
nº	= número
NADP	= nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato
NADPH	= nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato reducido.
NBS	= National Bureau of Standards
nm	= nanómetro
o	= orto
p	= para
p.a.	= pro analys
PGI	= fosfoglucona-isomerasa: D-Glucosa-6-fosfato cetol-isomerasa, E.C. 5.3.1.9.
P/V	= peso/volumen
r	= coeficiente de correlación lineal
S	= desviación típica
T	= Trasmisancia
Tm	= tonelada
U.R.S.S.	= Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas
U.S.	= United States
U.S.D.A.	= United States Department of Agriculture
V	= volumen
Vit.	= vitamina
U.I.	= unidades internacionales
U.V.	= ultravioleta
α	= alfa
β	= beta
Δ	= diferencia o incremento
ϵ	= coeficiente de extinción molar
μg	= microgramo

μl	= microlitro
μMol	= micromol
\$	= dólares
/	= por
%	= tanto por ciento en peso





1.- INTRODUCCION





1.1.- COMENTARIO AL CONCEPTO Y LEGISLACION

De acuerdo con nuestro C.A.E. (1967) se entiende por miel: "El producto azucarado natural, elaborado por las abejas (*Apis mellifica*, L. y otras especies), a partir del néctar de las flores y otras exudaciones de las plantas, sin adición alguna y que ha de responder a las siguientes características:

a/ Líquida, muy viscosa, pastosa o sólida, de color variable, olor aromático y sabor dulce agradable.

b/ Agua, no más del 22'5 por 100 del peso.

c/ Sólidos totales, no menos del 77'5 por 100 del peso.

d/ Sustancias insolubles, no más del 1 por 100 de los sólidos totales.

e/ Cenizas, más del 0'1 y menos del 0'6 por 100.

f/ Azúcares reductores, no menos del 70 por 100.

g/ Sacarosa, no más del 3 por 100.

h/ Dextrinas, no más del 8 por 100.

i/ Oximetilfurfurol, no más del 0'5 por 100.

j/ Índice de diastasas, no menos del 8 ni más de 10.

k/ Acidez máxima de 5 grados expresados en lejía alcalina décimo normal por 100 gramos de producto".

En disposiciones posteriores, B.O.E. (1975), se modifica esta definición introduciendo algunos conceptos defectuosos bajo nuestro punto de vista, pero mejorando en otros aspectos los criterios de composición.

En efecto, en la definición que se da en la "Norma sobre la miel" B.O.E. (1975), "Se entiende por miel la sustancia dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presente en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas y almacenan después en panales".

Por nuestra parte entendemos que esta definición no es correcta por cuanto se dice que es una sustancia

y en realidad se trata de un producto de extraordinaria complejidad, y además no se mencionan los nombres científicos de las especies productoras, en consecuencia resulta ambigua.

En estas últimas disposiciones oficiales se mencionan sus características y entre otras cosas se dice "que puede contener sacarosa, maltosa, melecitosa y otros oligosacáridos (incluidas las dextrinas)".

Nosotros entendemos que son componentes obligados en este alimento. En cuanto al color se dice que puede variar "desde casi incoloro a pardo oscuro o casi negro" y posteriormente en los métodos analíticos presentados no incluye la forma de evaluar este importante parámetro.

Otras definiciones subsidiarias son:

"a) Según su origen:

- Miel de flores: Es la miel que procede principalmente de los néctares de las flores.
- Miel de mielada: Es la miel que procede principalmente de las exudaciones de las partes vivas de las plantas o presentes en ellas. Su color varía de pardo muy claro a verdoso o casi negro.

b) Según su procedimiento de obtención:

- Miel en panal o en secciones: Es la miel depositada por las abejas en panales de reciente construcción y sin larvas, y vendida en panales enteros, no desoperculados o en secciones de panales.
- Miel Centrifugada: Es la miel que se obtiene mediante la centrifugación de los panales desoperculados, sin larvas.
- Miel prensada: Es la miel obtenida mediante la compresión de los panales, sin larvas, con o sin la aplicación de calor moderado".

Hemos de señalar que esta última suerte comercial, es cada vez menos utilizada en razón de merma de calidad.

En estas denominaciones subsidiarias se han modificado las anteriores del C.A.E. (1967) básicamente en hacer desaparecer las obtenidas en caliente o por batido.

En cuanto a los criterios de composición antes recogidos como características, se distinguen por separado para la miel y para la miel de mielada. De tal manera:

"2.1.1.- Contenido aparente en azúcar reductor, calculado como azúcar invertido: Miel de flores, cuando esta rotulada como tal, no menos de un 65 por 100. Miel de mielada y mezcla de miel de mielada y miel de flores no menos del 60 por 100.

2.1.2.- Contenido en humedad: No más del 21 por 100. Miel de brezo (Calluna): no más del 23 por 100".

Por nuestra parte nos parece más acertado la expresión "Contenido en agua" que el de contenido en humedad, que parece se refiera al contenido en agua absorbida higroscópicamente, etc. En cuanto a la expresión "Calluna" para englobar la flora de Ericáceas, vulgarmente conocida como brezo, nos parece muy limitado, dado que debería incluir numerosas especies del género Erica, y otros.

"2.1.3.- Contenido aparente de sacarosa: No más del 5 por 100. Miel de mielada y mezclas de miel de mielada y miel de flores: no más del 10 por 100.

2.1.4.- Contenido de sólidos insolubles en agua: No más del 0,1 por 100. Miel prensada: no más del 0,5 por 100.

2.1.5.- Contenido de sustancias minerales (cenizas): De 0,1 a 0,6 por 100.

Miel de mielada y mezclas de miel de mielada y miel de flores: del 0,5 al 1,0 por 100".

En estos últimos valores debemos destacar la diferencia de contenido aparente en sacarosa: Antes se admitía hasta un 3 por 100 como máximo. Ha sido elevada indiscriminadamente para las mieles de mielada hasta un 10 por 100, en base a muestras excepcionales de mieles

procedentes de Robinia, Lavanda y Banksia; cuando las mieles de mielada en la Bibliografía (Tabla I) y en nuestros resultados poseen un menor contenido en sacarosa. Así como, por el contrario, en sustancias insolubles en agua se ha pasado del 1 por 100 de la Legislación anterior a no más del 0,1 ó del 0,5 para la miel prensada.

Por lo que respecta al concepto de sustancias minerales que aquí se hacen equivalentes a los componentes inorgánicos tras la incineración (cenizas), no parece acertada la coincidencia de estos dos términos, no obstante, este parámetro es objeto de un estudio más completo en otro trabajo experimental donde será matizado adecuadamente. Si parece acertada la incorporación de un valor más amplio en este parámetro para la miel de mielada, pero no el valor inferior.

"2.1.6.- Ácidos: no más de 40 miliequivalentes de ácido por 1000 gramos". Este nuevo concepto, es más racional al anterior, que se expresaba en grados por 100. En ambas ocasiones parece debiera referirse también a la acidez libre, láctica y total haciendo distinción según su origen; e índice de formol como un parámetro a tener en cuenta.

Por último, en **"2.1.7.- Contenido en dextrinas:** Menos del 2 por 100 y hasta el 10 por 100 en la mielada.

2.1.8.- Actividad de la diastasa y contenido en hidroximetilfurfural: Índice de diastasas en la escala de Gothe, determinado después de la elaboración y mezcla: No menos de 8, siempre que el contenido de hidroximetilfurfural no sea mayor de 40 miligramos/Kg.

Mieles con un contenido bajo de enzimas naturales; por ejemplo, mieles de cítricos, contenido en diastasas en la escala de Gothe: No menos de 3, siempre que el contenido de hidroximetilfurfural no sea mayor de 15 miligramos/Kg".

El contenido atribuido a las dextrinas en estas disposiciones es más correcto que en la anterior, por cuanto distingue según la naturaleza de la muestra, si bien los valores para la miel de mielada nos parecen ele-

vados.

En relación al contenido en hidroximetilfurfural (denominación más adecuada que oximetilfurfurol) se ajusta mejor a la realidad. En el anterior texto resultaba inmensurable: 0,5 por 100 supondría 5000 mg/Kg. Además en la actual se contempla la relación entre este parámetro, que no sea mayor de 40 mg/Kg (coherente con la realidad) y el contenido en diastasas. Igualmente se tiene en cuenta las peculiaridades de las mieles de cítricos por su bajo contenido enzimático.

1.2.- COMPOSICION Y PROPIEDADES

La composición de la miel está influenciada por numerosos factores, que iremos desarrollando en el transcurso de este trabajo al hablar individualmente de cada uno de ellos.

La miel es un alimento de extraordinaria complejidad, ya en el anterior apartado hemos esbozado este aspecto al hablar de las características. Ahora bien, profundizando en esto, la Tabla I muestra la composición de la miel según los diversos autores.

La miel se caracteriza según White (1978), por las siguientes propiedades físicas:

- Viscosidad:

Estaría relacionada con el contenido de sólidos totales, al igual que el índice de refracción, pudiendo establecerse la relación de ésta con el contenido en agua de forma aproximada ya que los datos de los autores difieren.

La relación viscosidad-temperatura, además de la importancia en la tecnología de este alimento, pone de manifiesto que la mayoría de las mieles se comportan como líquidos newtonianos, atribuyendo como causas de que no se comporten como tales a ciertas proteínas y al alto contenido en dextrinas de algunas mieles.

- Propiedades térmicas:

Como el caso anterior el calor específico se relaciona con el contenido en agua. La sensibilidad térmica de la miel y su baja conductancia han supuesto una tecnología avanzada en el procesado de la miel que va desde el habitual intercambiador de calor, pasando por el horno de microondas hasta llegar al calentamiento dieléctrico.

- Higroscopicidad:

El contenido de agua de la miel está relacionado con la humedad relativa del ambiente, lo cual puede llevar al deterioro del producto si el procesado no es correcto debido a un incremento en el contenido de agua en la superficie que la hace susceptible a las levaduras aerobias.

- Cristalización:

Como factor intrínseco contempla la sobresaturación que presenta la miel con respecto a la glucosa y en algunas su elevado contenido en melecitosa. Como causas que favorecen la granulación están los núcleos de glucosa, polvo, polen y hasta burbujas de aire.

En el estudio de la granulación se han seguido dos caminos. El primero contempla los sistemas modelo, ya mediante diagramas ternarios o cuaternarios. El segundo, más práctico, busca una relación empírica (glucosa/agua o bien Grado Brix - Glucosa) con la conducta observada.

Glucosa

- Poder rotatorio:

Montes (1966) señala que las disoluciones de miel son levógiras, a excepción de las ricas en dextrinas y de coníferas que son dextrógiras.

TABLA I

Composición de la miel floral y miel de mielada, según diferentes autores

	F.A.O.	CASARES	SECCHI	I.C.W.W.D. I.W.C.A.P.	GEIGY	McGRFGOR	
	1955	1967	1967	1970	1975	1979	
							FLORAL NO FLORAL (mielada)
pH							3'91 4'45
Acidez libre (meq/Kg)							22'03 49'07
Acidez láctónica (meq/Kg)							7'11 5'80
Acidez total (meq/Kg)							29'14 54'87
Acidez láctónica/acidez libre							0'335 0'127
Sustancias nitrogenadas %		0'20-2'23					
Nitrógeno %							0'41 0'10
Proteínas %				0'2	0'3		
Cenizas %		0'06-0'65	0'2	0'2			0'169 0'736
Contenido en agua %	21'0	16'9-25'3	17'7	21'6	17'2	17'2	16'3
Azúcares reductores totales %			76'9	78'0	82'3		
Azúcar invertido %			75'0				
Glucosa %		29'9 39'6	34'5				31'28 26'08
Fructosa %		33'6 43'0	40'5				38'19 31'80
Maltosa %							7'31 8'80
Sacarosa %			1'9				1'31 0'80
Dextrinas %			1'5				1'50 4'70
Indeterminados %							3'1 10'1
Actividad diastásica (escala de Gothe)							20'8 31'9
Vit. A (U.I.)	0			Trazas	0		
Vit. B ₁ (mg por 100)				0'01	Trazas		
Vit. B ₂ (mg por 100)	0'05			0'07	0'04		
Vit. B ₆ (mg por 100)					0'01		
Acido nicotínico (mg por 100)	0'2			0'2	0'3		
Acido pantoténico (mg por 100)					0'06		
Vit. C (mg por 100)	2			4	1		
Otras vitaminas (mg por 100)					0'003		

1.3.- EVOLUCION DE LA APICULTURA

Aún, en la actualidad, forma parte principal de la alimentación de muchos pueblos. En Europa se recolectó desde épocas prehistóricas. Una representación famosa de recolección de miel, es recogida por la enciclopedia Larousse (1981), correspondiente al arte rupestre levantino que se halla en la cueva de Araña (Bicorp). Root (1976) menciona que arriba y abajo del río Nilo en Egipto, la apicultura migratoria era una práctica corriente en el continente africano 3.000 años a J.C. El ejemplo americano lo constituye que los incas ofrendaban miel en sacrificio al Sol...

El aprovechamiento de la miel se ha visto ampliamente modificado, al objeto de seguir la evolución hemos recopilado a continuación los pasos que han determinado su desarrollo y que son descritos por McGregor (1979).

1.3.1.- Colmena de bastidor movable y espacio para las abejas.

Las abejas se guardaban ya en una sección de tronco hueco, ya en una caja de madera o bien en una colmena de paja, en la que tenían espacio suficiente para construir panales en cualquier forma que les dictara el instinto. Sólo podían inspeccionarse los panales y recogerse la miel transtornando gravemente o destruyendo la colonia.

Durante siglos los griegos habían usado colmenares en los cuales los panales estaban suspendidos de trancas de madera colocadas a través de la parte de arriba, permitiendo recoger cada panal en particular.

El anterior método fue seguido en el continente europeo hasta que Dzierson, clérigo alemán, lo mejoró y usó en Alemania a principios del siglo XIX. Huber naturalista suizo ciego, diseñaría luego una colmena en la que el panal era sostenido por sus cuatro lados, por

cuadros que estaban dispuestos para desplegarse como las páginas de un libro. Antes del descubrimiento de Langstroth, el uso práctico del cuadro de cuatro lados fallaba porque estaba planeado para ajustarse estrechamente a los lados y a la parte de arriba del panal. Este descubriría la preferencia por parte de las abejas de un pasadizo de 9 mm. Un espacio más estrecho quedaba obturado con propóleos, lo que dificultaba la extracción de los panales, las abejas tendían a construir panales según su instinto en panales más amplios.

1.3.2.- Desarrollo del equipo moderno

En este aspecto dos inventos: la base de cera del panal y el extractor centrífugo de miel, concluyeron la evolución de la apicultura pasando ésta de ser una actividad agrícola marginal a su actual posición de gran importancia comercial.

La primera base de cera fué elaborada por un alemán, Johanes Mehring, en 1857. Una prensa de rodillo para producir la base fué fabricada comercialmente en 1876 por A.I. Root. Finalmente el uso de un refuerzo de alambre en la base fue introducido por Hetherington. El desarrollo de ésta ha sido más un proceso de refinamiento que de innovación.

La idea de un extractor centrífugo de la miel la aportó un austríaco, el Mayor Hrushka. Antes de este invento, la miel sólo podía extraerse cortando el panal de los cuadros, triturándolo y colando la miel para separarla de la cera. No es difícil imaginar sus inconvenientes...

El extractor de Hrushka fue modificado por Langstroth, Dadant, Quinby y muchos otros. El primer extractor comercial sería puesto a la venta por H.O. Peabody en 1870. La producción de miel líquida a gran escala era ya un hecho consumado.

Hemos descrito sucintamente el desarrollo de la

colmena y equipo moderno por parte del hombre, factores que han conducido al desarrollo de una cada vez más racional apicultura. Hemos dejado para el final de este improvisado resumen a la abeja, la flora, el clima y en suma a la naturaleza para darle la importancia que se merece.

1.3.3.- La abeja

De la existencia de muchas razas de abejas tenemos conocimiento. Un resumen de ellas aparece en la clasificación que realizan Melchor Biri y J.M. Alemany Albert (1976), Root (1976) entre otros. Haciendo referencia a sus características anatómicas y fisiológicas de estos himenópteros del género *Apis*.

La apicultura de nuestros días es producto, según McGregor (1979) de dos grandes descubrimientos prácticos en la conducta de las abejas. El ya mencionado de Lorenzo Lorraine Langstroth del espacio de las abejas y el otro hallazgo, debido a G.M. Doolittle, fue la posibilidad de criar gran número de reinas pasando larvas a las celdas de la reina.

Con el apareamiento controlado de las abejas, un método ahora muy perfeccionado y seguro se ha llegado a la consecución de abejas híbridas. En un futuro que estamos viviendo hoy, las reinas serán inseminadas artificialmente y el apicultor moderno usará diferentes razas de abejas para distintas regiones y propósitos.

La abeja melífera es importante no únicamente por la producción de miel, polen, cera y propóleos sino también por su actividad polinizadora e incluso como animal de investigación en estudios biológicos.

1.3.4.- La flora

Las plantas melíferas, fuentes de néctar y polen son descritas entre otros por los anteriores autores agru

pándolas por orden, familia, especie, época de flujo del néctar y calidad del mismo.

1.3.5.- El clima

Un audaz tratamiento del clima como factor condicionante de la apicultura lo realiza Root (1976), en cuanto que afecta a los demás factores y hace una clasificación de las diversas regiones apícolas del mundo en base a todos ellos.

La apicultura es en sí un arte y un compendio de ciencias. La abundante bibliografía existente sobre todos los temas lo demuestra y está fuera de nuestros conocimientos y capacidad.

1.4.- PROCESADO

Para extraer la miel, primero es necesario desopercular el panal. Pueden utilizarse un cuchillo frío, el cuchillo y la garlopa de mano calentados eléctricamente y a vapor. Una versión más refinada consiste en emplear un cuchillo montado en un bastidor sobre resortes de acero que se hace vibrar con un motor eléctrico. A gran escala con máquinas que llevan los panales por un dispositivo desoperculador.

Existen numerosos tipos de extractores en uso pero dos son los más empleados actualmente: Los de canasta reversible y los radiales. Ambos usan la fuerza centrífuga para sacar la miel del panal.

En los primeros la miel se extrae aplicando la fuerza centrífuga primero a un lado del panal y luego al otro ya sea con inversión manual o automática.

Los extractores radiales varían en tamaño, de 12 a 50 cuadros por carga en contraposición con los 2 a 16 de los anteriores. Estos poseen un mayor rendimiento. Detalles sobre su manejo se refieren en la correspondien-

te cita bibliográfica.

Los opérculos y la miel extraída de los panales en la operación de destapamiento deben separarse para recobrar la miel y la cera, con cuidado de no menoscabar la calidad de la miel en aspectos como: sabor, color y aroma. Los métodos empleados son los siguientes: escurrido por gravedad, por fuerza centrífuga, prensado, flotación y mediante separador centrífugo.

La miel que ha pasado por las operaciones de desoperculado y extracción se vierte por lo general en un **colector**. Este recipiente puede tener una serie de reguladores o cedazos o ambas cosas, para eliminar las partículas gruesas de cera y otras sustancias extrañas.

Después de que la mayor parte de la cera ha sido separada de la miel en el tanque colector, la sedimentación resulta altamente satisfactoria.

Para asegurarse de que la miel satisface los requisitos de calidad se hace necesaria su filtración o colado ya sea mediante cedazos de metal, granito triturado, arena de sílice o tela. La temperatura de 46°C en el proceso de colado facilita enormemente la operación ya que aumenta la fluidez de la miel sin ablandar notablemente las partículas de cera.

El calor aplicado en aquellos límites suele ser muy conveniente en la manipulación de la miel: disuelve las partículas gruesas cristalizadas y destruye las levaduras, de esta manera como veremos más adelante, se evita la fermentación y se retarda la granulación.

Se usan con éxito varios métodos de calentamiento. Desde el que es empleado habitualmente que utiliza peroles poco profundos, con la superficie inclinada, calentados con agua (al baño María); tanques con camisa de agua, hasta el más moderno intercambiador de calor como describen Root (1976) y McGregor (1979).

Rara vez se toman las precauciones necesarias para enfriar la miel después del calentamiento hasta una temperatura apropiada. Sin embargo para evitar el menoscabo en la calidad de la miel, es esencial enfriarla inmedia-

tamente después de que ha pasado por el calentador.

1.5.- PRODUCCION, COMERCIO MUNDIAL Y USOS

La miel de abeja se produce prácticamente en todos los países del mundo. Siendo de destacar la U.R.S.S. y los EE.UU. como primeros productores, véase Tabla II elaborada con datos del trabajo de White (1978) y referida al año 1975 (Fuente U.S.D.A.).

Otros productores importantes según se puede observar en la referida tabla son: México, Argentina, Canadá, etc. España ocupa el décimo lugar de la lista de productores, siendo el cuarto en cuanto a exportación.

Más recientemente en la revista Ceres de la F.A.O. (1980) se recogen los principales exportadores netos de miel referidos al comercio del año 1978. En la Tabla III puede observarse como España aparece como sexto país exportador y quizás como detalle a tener en cuenta el precio por tonelada en dólares es el segundo después de Hungría, con un valor que supone el doble de la cotización del primer exportador.

Dos son los usos principales de la miel: en Bromatología y en Farmacia.

Como alimento diremos que es típicamente energético, por su composición, y es consumido directamente como alimento edulcorante natural. El pequeño aporte de sustancias minerales, muy variable de unas a otras, no es significativo.

Además de su uso director, como edulcorante natural, viene a emplearse en confitería (turrónes, pasteles, caramelos, etc.).

En Farmacia ha sido utilizada como excipiente y cuadyuvante de preparaciones farmacéuticas. La Farmacopea Española IX Ed. (1954) y Font-Quert (1962) dedican varias páginas a preparados en los que interviene la miel (agua-miel, aloja, talosomeli, vino de miel, velomeli, oximiel, jalea real, etc.).

TABLA II

Producción y comercio internacional de la miel según White (1978).

PAIS	PRODUCCION en Tm	IMPORTACION en Tm	EXPORTACION en Tm
U.R.S.S.	117.026	--	--
E.E.UU.	96.343	11.430	3.946
MEXICO	36.423	--	26.172
ARGENTINA	23.496	--	17.282
CANADA	22.816	408	5.987
AUSTRALIA	19.822	--	7.167
TURQUIA	16.783	--	--
ALEMANIA OESTE	12.338	44.406	1.542
POLONIA	10.523	--	318
ESPAÑA	9.344	--	8.255
CHINA	--	--	14.016

TABLA III

Exportaciones y volumen económico de algunos países.

PAIS	Exportaciones netas		
	Toneladas	Precio por Tm (\$)	Miles de \$
MEXICO	44.936	623	27.991
CHINA	28.120	895	25.170
ARGENTINA	27.000	852	23.000
U.R.S.S.	10.144	830	8.419
CANADA	6.452	1.081	6.976
ESPAÑA	5.084	1.273	6.471
HUNGRIA	5.000	1.420	7.100
CUBA	5.000	800	4.000
BULGARIA	4.348	989	4.300
AUSTRALIA	4.161	1.094	4.555
BRASIL	4.000	725	2.900

Fuente: Ceres (F.A.O.).

1.6.- CONSIDERACIONES SOBRE LOS PARAMETROS SELECCIONADOS EN LA CALIDAD DE LA MIEL.

1.6.1.- Color y turbidez

Las diversas clases de miel difieren en color, aroma y sabor.

El color está relacionado con la flora y en consecuencia con su composición. Así prototipos de mieles claras son las de leguminosas forrajeras (tréboles blancos, trébol rojo, alfalfa, melilloto, etc.), siendo otros vegetales el tilo, el frambueso silvestre o zarzamora, el sauce, el pepino y otras curcubitáceas, el manzano, el algodónero, el campeche, la campanilla, etc.; distribuidas según su clima natural. La miel de color ámbar procede de variada flora melífera, entre la que encontramos: solidago, zumaque (silvestre), magnolia, álamo, eucalipto, caléndula, ciruelo, etc. La miel oscura es producida por dos ejemplos típicos: el alforfón, en América y Europa, y los brezos en Europa solamente. Root (1976).

Otros autores relacionan el color con la composición del néctar y factores que afectan a éste.

Sanz Pérez y Triguero Rodriguez (1970) exponen en su trabajo la relación entre el color de la miel y los diversos componentes de la misma. Afirman que cuanto más oscura es la miel tanto mayor es su acidez y su contenido mineral. Las de colores claros contienen más oligosacáridos que las oscuras; éstas, sin embargo, son más ricas en dextrinas.

Las reacciones responsables del oscurecimiento de la miel fueron clasificadas en tres grupos por Lynn, Englis y Miliun, según recoge Root (1976).

La primera es la combinación aminoácido-aldehído (reacción de Maillard). Su importancia sería puesta de manifiesto por Ramsey y Miliun en 1933 al señalar que la adición de formaldehído prevenía el oscurecimiento de la miel durante el almacenamiento al igual que la adición de sulfitos de Wootton.

En segundo lugar la combinación de tanatos y otras sustancias polifenolísticas con sales de hierro mencionada por Ramsey y Milium (1933) al observar el color negro aparecido en mieles conservadas en recipientes estañados, aunque no lo diferenciara del producido por elevadas temperaturas que resulta ser uniforme en toda la masa.

Y en tercer lugar la inestabilidad de la fructosa.

Los autores están de acuerdo en que la temperatura y el tiempo de almacenamiento determinan la magnitud del oscurecimiento de la miel, en menor grado la composición de la miel.

La turbidez está relacionada con las materias en suspensión y es un parámetro de calidad.

1.6.2.- Acidez (pH, acidez libre, láctónica y total) e índice de formol.

El pH medio es próximo a 3,9 con una oscilación para 490 muestras de 3,4-6,1, según White (1978) para las mieles de EE.UU. El Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974) indica que las mieles de mielada no poseen un pH como las de origen floral, de 3,3 a 4,6, sino que puede llegar a 5,5 en razón de su elevado contenido en sales tampones.

El nivel de acidez activa contribuye a la estabilidad de la miel frente a los ataques microbianos.

El efecto combinado de la acidez y el peróxido de hidrógeno que se produce, se ha pensado sirva para preservar el néctar durante el proceso de maduración. Burgett (1974) demostró que esto mismo ocurre en otros nueve himenópteros sociales.

Los ácidos de la miel aunque constituyen un 0,5% poseen un efecto pronunciado en el sabor según McGregor (1979).

El principal ácido de la miel, en equilibrio con la gluconolactona es el ácido glucónico (Stinson y col.

1960). Es producido por la acción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa de la miel, esta reacción es extremadamente lenta en mieles muy densas pero es rápida cuando la miel es fluída. Se ha sugerido que este ácido se produce a partir de la glucosa del néctar durante su transformación en miel, la cantidad de ácido glucónico en la miel es reflejo de varios factores, siendo el más importante el tiempo que transcurre entre la recolección del néctar y el máximo llenado en el panal, dado que la acción de la glucosa oxidasa se detiene a concentraciones altas. Otros factores, a parte del contenido en azúcar en el néctar, que influyen en la acción de la enzima son: el tiempo, la fortaleza de la colmena, calidad y volumen del flujo del néctar. Si el tiempo de maduración del néctar se alarga puede ser necesaria la adición por parte de la abeja de más enzima.

Se han identificado en la miel por procedimientos extremadamente rigurosos diez ácidos orgánicos y probablemente existan otros siete más. El primer grupo incluye al acético, butírico, láctico, piroglutámico (Stinson y col.), cítrico y succínico (Nelson y Mottern), fórmico (Vogel), ácido maleico (Goldschmidt y Buerkert), málico (Hilger) y oxálico (Von-Philipsborn). En el segundo grupo están el glicólico, α -cetoglutárico y el pirúvico (Maeda y col.), tartárico (Heiduschka y Kaufmann) y 2 y 3 fosfoglicérico, α y β glicerofosfato y glucosa 6 fosfato (Subers y col.). Citados por White (1978).

El procedimiento actual, como ya dijimos mide la acidez libre y la lactónica. De numerosos ejemplos de miel de EE.UU. sólo se encontraron dos que no contenían gluconolactona, siendo sus pH extremadamente altos. White y col. (1962).

Las muestras neutralizadas pueden utilizarse en la valoración del índice de formol, como medida representativa del contenido en nitrógeno.

El contenido de nitrógeno en la miel es pequeño y variable. White (1978). Una tabla de este trabajo muestra una media para la miel de EE.UU. de 0,04% y una desviación del 63%. La mayor parte del nitrógeno no proteico

está en forma de aminoácidos libres, y la cantidad de éstos según McGregor (1979) es muy pequeña y no tiene importancia desde el punto de vista alimenticio.

La valoración con formol, que es esencialmente una medida global del contenido total de aminoácidos, péptidos y proteínas fue aplicada por Tillmans y Kiesgen, quienes propusieron que podría ser usada para comprobar la autenticidad de la miel. Schuette y Templin demostraron que los valores europeos para este parámetro no eran aplicables a las mieles de los EE.UU. que poseen un índice más pequeño y variable. Lothrop y Geertler describen un procedimiento para grupos amino en la miel, encontrando una media de 0,0033 por 100 (amplitud 0,0024-0,0066 por 100). Schuette y Baldwin encontrarían promedios del 0,0034 por 100 para mieles claras y 0,0058 para las mieles oscuras, todos ellos recogidos por White (1978).

La introducción de la cromatografía de papel renovó el interés de los aminoácidos de la miel, distintos investigadores identificaron más de 17 aminoácidos en varios ejemplos. Según McGregor (1979) han revelado que las mieles contienen de 11 a 21 diferentes aminoácidos libres siendo los más comunes la prolina, ácido glutámico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina.

Komamine como se describe en la obra de White (1978), utilizando la cromatografía cuantitativa de papel fué el primero en señalar que la prolina era el aminoácido preponderante. Más tarde se usó el analizador automático de aminoácidos para la miel y hoy hay disponibles gran cantidad de datos.

Davis (1976) realizó un estudio de aminoácidos en 98 muestras de miel y lo aplicó a fin de establecer el origen geográfico de las mismas. Posteriormente refinó esta aproximación usando una selección computerizada de 60 relaciones entre aminoácidos, asignando correctamente 15 de los 16 ejemplos, demostrando así que la variación entre las fuentes de procedencia es mayor que el de las áreas de producción.

Dado que el polen contiene alrededor del 1,5 por 100 de aminoácidos, predominando la prolina, Komamine sugirió que está era la fuente. El néctar contiene pequeñas cantidades de aminoácidos libres y Davis calculó que su contribución a la prolina total es muy pequeña. Bergner y Hahn notan que abejas alimentadas artificialmente daban mieles conteniendo un 80% de promedio de prolina que una miel floral, lo que atribuye ésta a las abejas. Petrov relata la importante función que desempeña la prolina en el cambio aerobio de los productos musculares de todos los insectos, aspectos que son recogidos por McGregor (1979).

Tienen influencia en el color como ya se ha dicho, puesto que los aminoácidos reaccionan con los azúcares para formar sustancias amarillas o pardas. Parte del oscurecimiento de la miel al paso del tiempo o al calentamiento puede deberse a esto (Reacción de Maillard).

El índice de formol según el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires, de una miel varía entre 0,45 y 1,55. Un índice de formol especialmente bajo puede poner de manifiesto una adulteración o falsificación por medio de miel artificial, o miel producida por abejas alimentadas artificialmente. Un valor superior tampoco sería normal y denotaría un fraude. En estos momentos a los alimentos de las abejas se les incorpora hidrolizados de proteínas lo que puede influir en este parámetro.

1.6.3.- Sustancias minerales

Como ya hemos indicado, al comentar la Legislación Española aunque se suele hacer coincidir el contenido en sustancias minerales con el de cenizas, rigurosamente no es apropiado.

La extraordinaria variabilidad de la composición de la miel se refleja también en el contenido de cenizas. En la Norma sobre la miel (B.O.E. 1975) se matiza en función de su origen (miel de flores o miel de mielada o mezclas de ambas), la diferencia en su contenido en ce-

nizas, parámetro que anteriormente no era distinguido en el C.A.E. (1967).

Para el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974) las mieles de flores tienen un contenido de 0,1 por 100 a 0,35 por 100, y las mieles de mielada hasta el 1 por 100 o más. McGregor (1979) y White (1978) exponen que varía entre 0,02 a ligeramente más del 1 por 100 en la miel floral encontrándose un promedio de 0,17 por 100 para un total de 400 muestras analizadas.

Cabe destacar que el elemento predominante es el potasio, que constituye una tercera parte de las cenizas, mientras que el contenido de sodio es como mucho la décima parte. Schuette y col. de la Universidad de Winconsin publicaron una tabla en la que figura el elemento mineral, color de la miel, número de muestras, amplitud y promedio y una segunda relaciona el elemento mineral y el color de la miel ya sea clara u oscura, reproducidas en la obra de Nahmias (1980).

McGregor (1979) señala que la miel no floral (proveniente de secreciones de las plantas) es más rica en minerales, tanto es así que su contenido mineral es la causa principal por la cual no es apropiada para el almacenamiento en invierno.

Aunque el porcentaje de materias minerales que contiene la miel es pequeño comparado con el de otros componentes, está claro que existe una fuerte relación con el color y de aquí su interés.

Algunos autores dan importancia, desde el punto de vista alimenticio, al contenido mineral de la miel. Así, Nahmias (1980) químico francés especializado en miel, expone que ésta contiene fosfato de calcio y hierro y que se encuentra en formas fácilmente digeribles al igual que las demás sales minerales. El porcentaje de sales minerales es muy pequeño en comparación con los otros elementos adecuados, pero en éste se encuentran más elementos útiles y en su adecuada proporción de tal forma que la hacen especialmente idónea en la dieta.

Los componentes minerales aparte de adecuada pro-

porción de azúcares, convierten a la miel en un alimento azucarado muy superior a los azúcares refinados y jarabes.

La literatura científica sobre el contenido de los minerales traza en las mieles de otras partes del mundo fue revisada por White (1978) incluyendo el trabajo de Tong y col. en el que realizaron un examen analítico del valor de los minerales traza en la miel con un "indicador de polución". Encontraron trazas de 41 elementos en 19 ejemplos de miel del estado de Nueva York, en muestras recolectadas por las abejas en las proximidades de la autopista aparecieron niveles elevados de elementos que se sabe son emitidos por motores de combustión.

1.6.4.- Contenido en agua

El contenido en agua de la miel es variable. Los valores típicos se han reflejado en la tabla de composición general.

Este, como es lógico está relacionado con el clima, la flora (nuestra legislación permite un contenido máximo de agua del 21% en la miel de Calluna), con la zona geográfica y con las labores apícolas. De forma que, en los climas húmedos se recomienda extraer la miel del panal cuando éste está totalmente operculado, pudiéndose en climas secos realizarse la extracción cuando las tres cuartas partes del panal se hayan en tal circunstancia.

Un estudio de la composición de las mieles de Estados Unidos realizado por White y col. (1962) relaciona el contenido en agua con la región geográfica donde ha sido producida. Su composición viene afectada así mismo por valores estacionales, aunque en menor cuantía.

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (U.S.D.A.) requiere para que una miel sea considerada de alta calidad, que ésta no contenga más de un 18,6% de agua. La miel que se vende está generalmente mezclada para obtener menos de un 18,6%. En términos generales

una miel que contiene un valor más alto no ha madurado por completo en la colmena.

Los principales factores de inestabilidad en la miel son la granulación y la fermentación. La tendencia a cada uno se relaciona con el contenido en agua.

La fermentación por levaduras tendrá lugar si la combinación de contenido en agua, temperatura y cantidad de levadura es adecuada.

Root (1976) afirma que cuanto más elevado es el contenido de agua menor será la tendencia a granular, White (1978) señala que este fenómeno puede ser fácilmente predecible en función de la relación glucosa/agua y Hadorn y Zücher (1966) resaltan el efecto de la temperatura en este proceso.

En resumen: Si la relación glucosa/agua es menor de 1,7 la miel no granulará, si es mayor de 2,1, según Montes (1966), lo hará completamente.

La granulación se acelera entre los 12,8°C y los 15,6°C, las temperaturas de almacenamiento óptimas serán entre los 10°C y los 12,8°C.

Por último, se hace mención a la importancia de la limpieza del material, para que no tenga cristales de glucosa u otras partículas que actuarían como "núcleos" de cristalización.

La granulación y la fermentación están íntimamente relacionados puesto que cuando una miel granula el resultante aumento del contenido de agua en la parte líquida favorece la fermentación.

La fermentación de la miel es causada por la germinación y desarrollo de levaduras que normalmente se encuentran en ella. Estas levaduras llamadas osmófilas, pueden crecer en concentraciones más altas de azúcares que otras, no obstante a partir de ciertas concentraciones no crecen.

Recoge McGregor (1979) que cuando la miel absorbe agua como sucede cuando una miel se almacena en un lugar

con más de un 60% de humedad relativa, el contenido inicial de agua aumenta principalmente en la superficie, antes de propagarse a toda la miel. En esta circunstancia, las levaduras crecen aeróbicamente (usando oxígeno) en la superficie y se multiplican rápidamente, mientras que bajo la superficie el crecimiento es más lento. Por esta razón, la miel debe guardarse en recipientes herméticamente cerrados, sobre todo en climas como el de Galicia, con una humedad relativa alta.

Según McGregor (1979) una miel con menos de un 17,1% de agua, no fermentará, independientemente del recuento de levaduras. Con un porcentaje en agua del 17,1 a 18,0 una miel con un contenido de 1000 ó menos esporas por gramo estará a salvo por lo menos un año. Cuando la miel contiene más de un 18,0% con más de 10 esporas de levadura por gramo fermentará, contenido tan bajo es difícil de encontrar.

La miel con un alto contenido de agua no fermentará a una temperatura menor de 10°C ni por encima de 26,7 °C, estas últimas temperaturas de almacenamiento no son adecuadas porque perjudican a la miel como veremos más adelante. A una temperatura de 15,6°C fermenta hasta una miel con un contenido relativamente bajo de agua.

La miel madurada naturalmente posee un contenido de agua entre el 17,5 y 18% con una actividad del agua del 0,58, necesitando una inoculación natural de 1000 esporas/gramo para fermentar.

Una miel con un contenido de agua superior al 18,6% a menos que haya sido calentada a 71°C, podrá fermentar después de que haya comenzado a granular. Este calentamiento deberá realizarse con cuidado para no alterarla: en color, perder aroma, fino sabor, incrementar su contenido en hidroximetilfurfural y producir una pérdida en su actividad diastásica. En cambio si la miel es calentada y envasada herméticamente y enfriada rápidamente, estará a salvo durante un período de un año y algunas veces por un tiempo más largo.

1.6.5.- Azúcares

La miel es principalmente, como es sabido, un alimento glucídico. En efecto, los azúcares representan del 95 al 99,9% de los sólidos de dicho producto según McGregor (1979).

Por mucho tiempo se pensó que la miel estaba compuesta principalmente por glucosa y fructosa, con algo de sacarosa y dextrinas en cantidades menores, éstas se consideraban azúcares complejos, escasamente definidos y de peso molecular alto.

Con el desarrollo de nuevos métodos de análisis y separación de azúcares investigadores de Europa, EE.UU. y Japón entre los que se encuentran Elser, van Voort, White, Hoban, Watanabe, Also, Siddiqui, Furgala y Doner han hallado muchos azúcares en la miel y, en algunos casos, los han aislado e identificado por métodos físicos y químicos adecuados y no simplemente por la movilidad en cromatografía. Hasta la fecha se han aislado e identificado un número de 33 azúcares diferentes en la miel.

El factor más importante que condiciona la composición de azúcares en la miel es la flora.

Para una mejor comprensión de la distribución de los azúcares en la miel véase el trabajo de White (1978) en el que aparece el número de muestras y variación en el contenido de: fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa, azúcares superiores y la relación fructosa/glucosa.

La cromatografía de papel utilizada como proceso de separación indica que todos tienen el mismo tipo de azúcares.

Es de destacar que sólo tres de las muestras de miel poseen una relación fructosa/glucosa menor que 1,0.

La procedencia floral tiene una gran influencia como se ha indicado anteriormente, en la composición de carbohidratos; las influencias del clima y origen geográfico son mucho menores.

Los azúcares son responsables en gran parte de las propiedades de la miel. Baste recordar que las propiedades antibacterianas dependen de la concentración de los mismos, que la relación glucosa/agua condiciona la granulación, que su defecto en relación con el contenido de agua y el contenido en levadura dan idea de la fermentación junto con la temperatura, etc.

Pero aquí nos interesa destacar su sabor dulce, sabor que no sólo depende de ellos sino de los ácidos, sustancias nitrogenadas y minerales; pero son ellos en gran medida los que dan el sabor a la miel.

Ha sido estudiada la dulzura de la miel con relación a la de los distintos azúcares por Browne, Willman (Root, 1976) y Braverman (1963) entre otros, situándola en ambos casos próxima a 100 (valor de referencia atribuido a la sacarosa). Los dos primeros autores le asignan un valor ligeramente superior a 100, en tanto que el tercero un valor ligeramente inferior: 97.

Los cambios más obvios en el contenido de azúcares de la miel durante la maduración son dos: la inversión de la sacarosa y la "transglucosidación" de azúcares que persisten en el producto madurado.

Ciertos tipos florales dan lugar a mieles con un alto contenido en sacarosa (10% ó más) lo que puede llevar a dificultades legales pues exige un valor máximo del 5%. El tiempo requerido para que la disminución en el contenido en sacarosa se acomode al máximo legal es variable. Así, la miel de "*Bauksia menziesii*" descendió de un 8-12% inicial a la mitad en un año de almacenamiento al igual que la miel de *Robina pseudoacacia*. La miel de la falsa acacia descendió su contenido en sacarosa de un 9,6-12,7% a un 1,7-4,3% en un año de almacenamiento en contraposición con los resultados de la anterior. Tres muestras de mieles de cítricos con un contenido en sacarosa de 5,3, 7,1 y 9,3, dieron un resultado al cabo de doce semanas de almacenamiento a temperatura ambiente de 2,9, 3,1 y 2,2% respectivamente (White, 1978). Se comprende que la magnitud de la actividad enzimática es decisiva.

Los cambios en el contenido de otros carbohidratos fueron estudiados por Taüfel y Muller empleando como técnica la cromatografía en papel. Usando procedimientos analíticos más apropiados y tratamientos estadísticos White y col. (1961) examinaron el efecto del almacenamiento de la miel en la composición de los carbohidratos con muestras almacenadas durante dos años a temperatura ambiente, sin inactivación enzimática excesiva. El almacenamiento causó un aumento del 69% en los disacáridos reductores, un pequeño aumento en la sacarosa y azúcares superiores a costa de la glucosa y fructosa que decrecieron un 13 y 5,5% respectivamente; con respecto a alícuotas de miel almacenadas a -20°C .

Estos cambios aparentemente podían ser causados por dos mecanismos: el de la actividad enzimática y el de la reversión ácida. En soluciones concentradas de monosacáridos en presencia de ácidos tiene lugar la formación de disacáridos y azúcares superiores, según Pigman y Goepp (1948).

1.6.6.- Enzimas

Desde hace más de un siglo se sabe que la miel contiene enzimas, cuando Erlenmeyer y Planta demostraron su presencia en las abejas, el polen y miel como recoge White (1978).

En los últimos años han recibido una mayor atención investigadora, pero sin embargo han soportado la mayor carga de desconocimiento en la prensa científica.

La mayor cantidad de trabajos sobre las enzimas de la miel, están relacionados como veremos, con su uso como indicadores de calidad, identidad de la miel, así como su respuesta al calor y al almacenamiento.

Muchos países además de España requieren valores mínimos para la actividad diastásica (o amilásica) y han propuesto el uso o tipificación de otras enzimas para los propósitos anteriores.

Las enzimas de la miel más importantes son tres: amilasa, invertasa y glucosa oxidasa. También están presentes la catalasa y la fosfatasa.

Las cantidades de estas enzimas que se encuentran normalmente en la miel no calentada, el número de muestras que permitieron calcular su actividad, los investigadores que las dieron a conocer y sus unidades están recogidas en el trabajo de White (1978) al igual que un estudio completo de dichas enzimas en cuanto a su origen, descubrimiento, constantes de actividad enzimática, ecuación y factores a que ésta obedece; e isoenzimas.

Las enzimas desde el punto de vista alimenticio no tienen importancia.

Para la miel que intenta exportarse a países que exigen unos valores mínimos de diastasas y en algunos casos de invertasa, el efecto del almacenamiento sobre la inactivación de dichas enzimas es de suma importancia.

Muchos trabajos describen el efecto de la temperatura elevada sobre la actividad enzimática, particularmente sobre las diastasas. Pero fué Schade y col. (1958) quienes aplicaron un método cuantitativo para las diastasas registrando el efecto de almacenamiento a 20°C. La pérdida se describe como "pequeña" pero significativa en muchos casos, puede calcularse alrededor de un 10% en 13-15 meses. Más tarde White y col. (1964) sugirieron que los cambios pueden predecirse sobre un margen de temperaturas de 10 a 80°C.

Una relación entre la actividad enzimática y el hidroximetilfurfural según las condiciones de almacenamiento y calentamiento es incluida en el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires. En esta obra, Duisberg y Hadorn han publicado nuevas sugerencias para la apreciación de las diferentes clases de miel que se encuentran en el comercio, sirviendo de base para que otros autores propongan valores máximos para el hidroximetilfurfural y mínimos para las enzimas (diastasa e invertasa) en la miel.

1.6.7.- Hidroximetilfurfural

Varias pruebas colorimétricas fueron descubiertas hace años para indicar la adición de almíbares y azúcares invertidos a la miel. Estos, el del resorcinol (Fiehe) y el de la anilina (Feder), se han estudiado y modificado continuamente.

El hidroximetilfurfural se forma a partir de los azúcares favoreciéndose al añadir ácido y calentar. La cantidad mínima detectable depende de la sensibilidad del método y del azúcar usado.

Desde hace tiempo, Browne (1908) reconoce que si se calienta suficientemente la miel daría una prueba positiva.

Lampitt y col. (1931), Gautier y col. (1961) basándose en trabajos realizados por Shannon, Sherwood, Greenleaf y Browne llegan a concluir que las pruebas colorimétricas eran útiles para distinguir la adulteración del proceso de almacenamiento. Llegando a sugerir más tarde estos últimos que un prolongado almacenamiento podría conducir también a una acumulación de hidroximetilfurfural suficiente para dar positivo, siendo el tiempo requerido función de la temperatura de almacenamiento.

La publicación por Winkler (1956) de dos métodos cuantitativos para la determinación de hidroximetilfurfural en la miel sirvió para que los países europeos establecieran límites para el contenido del mismo en relación a los valores de diastasa, ya que suponen que sus propiedades características y organolépticas están viciadas por el calor. Esto dió lugar a un gran número de trabajos.

Así Schade y col. (1958) empleando el método cuantitativo de Winkler, demuestra la variabilidad entre las mieles y que los efectos de almacenamiento, calor, y factores de composición influían en la formación de hidroximetilfurfural y relacionó esta formación con su contenido inicial y la humedad, amén de otros factores desconocidos.

El de Duisberg y Hadorn en el que resumen el análisis de 1554 mieles importadas y realizado en laboratorios de Suiza y Alemania entre los años 1960 y 1966 y que recoge el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974).

Lampitt y col. (1931) fueron los primeros en demostrar el efecto positivo que tiene la acidez en la formación de hidroximetilfurfural. Hadorn (1961) atribuyó el menor grado de formación de éste en mieles suizas calentadas a su alto pH (4,5-5), en contraste con la mayoría de las otras mieles (pH = 3,8).

Numerosos investigadores han estudiado el incremento de hidroximetilfurfural con la temperatura. Así: Schade y col. (1958) lo determinan en mieles almacenadas a 20°C durante 13-15 meses dando un incremento de 3,3 mg% en un caso; Hadorn y Kovacs (1960) estudiaron el efecto del almacenamiento en varios tipos de miel importada a 50°C y Hadorn y Zücher (1962) el contenido de hidroximetilfurfural en bidones que se licuaron, alcanzando la temperatura de 48°C en 24 horas; el incremento en los tres tambores resultó de 1,2 a 2,2, 2,7 y 2,4 mg% respectivamente. White (1964) sometió tres muestras de miel a almacenamiento en un margen de siete temperaturas entre -20°C y 60°C analizando su contenido y determinando gráficamente el tiempo aproximado que requiere una miel para acumular 4 y 20 mg de H.M.F. por 100 gramos. El uso efectivo de los niveles de hidroximetilfurfural para demostrar la adición de azúcar invertido a la miel, requiere tener en cuenta las condiciones de almacenamiento y procesado así como la variabilidad que en el aumento de hidroximetilfurfural poseen las mieles según el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974).

1.7.- CONSIDERACIONES SOBRE EL PROCESADO Y ALMACENAMIENTO

Tras los comentarios efectuados sobre los parámetros objeto de estudio se pueden hacer las siguientes consideraciones en favor de una correcta comercialización de este alimento.

Los problemas a considerar en el procesado y almacenamiento de la miel son: la granulación, la fermentación; daño al aroma, color y sabor, y cuando estas mieles van destinadas a países europeos o que así lo exijan, los valores mínimos de enzimas (diastasa e invertasa), y máximos para el hidroximetilfurfural.

Y es aquí cuando todo lo dicho tiene un sentido práctico. La granulación se detiene por debajo de $12,8^{\circ}\text{C}$ y es máxima entre $12,8$ y $15,6^{\circ}\text{C}$, y su tendencia también depende de la relación glucosa/agua tomando como valor discerniente el de 1,7. La fermentación, está íntimamente relacionada con aquella, ya que al aumentar el contenido en su superficie ésta se hace más vulnerable. La fermentación de una miel se produce si las condiciones de humedad, temperatura y contenido en levaduras son favorables; una miel con un contenido en agua inferior a un 17,1 no fermentará al igual que una miel conservada a temperatura inferior a 10°C ni por encima de $26,7^{\circ}\text{C}$, pero, cuando éstas no son las condiciones, el recuento de levaduras es decisivo, y se hace necesaria su pasteurización. La temperatura superior a $26,7^{\circ}\text{C}$ no es adecuada por el deterioro que sufriría la miel con respecto al color, aroma, sabor, diastasas e hidroximetilfurfural, por lo que en general deben almacenarse de 10 a $12,8^{\circ}\text{C}$. Una reducción de la temperatura que puede obtenerse con aire acondicionado mantendría en un nivel aceptable el contenido de hidroximetilfurfural, evitaría la disminución de la actividad diastásica y no habría pérdida de sabor y aroma ni oscurecimiento, conservando así la miel en estado satisfactorio, casi como acabada de extraer del panal, según McGregor (1979).

Cuando por el aspecto indicado arriba es necesario pasteurizarla, es preciso buscar las condiciones en las que se evite la granulación y la fermentación, sin perjuicio de los demás parámetros. Aunque una temperatura de 60°C durante 30 minutos, es suficiente para pasteurizar una miel, no lo es para licuar los cristales de glucosa que actúan como núcleos de granulación. Las condiciones más adecuadas para lograr este propósito son someter la miel a 71°C durante 30 minutos en un recipiente

cerrado provisto de dispositivo de agitación y rodeado por un baño María.

Temperaturas más altas no son recomendables pues llevan a la pérdida de aroma, aumento de color y de hidroximetilfurfural e inactivación de enzimas. Después de ésto se hace necesario un rápido enfriamiento evitando el calor de apilamiento con los mismos efectos perjudiciales arriba indicados. Es necesario comprender que los perjuicios por calentamiento y almacenamiento se suman.

Así pues, conservar la miel en su estado original de alta calidad, delicioso sabor y fragancia es posiblemente la mayor responsabilidad del apicultor y del envasador. Es, al mismo tiempo, la operación que recibe menos atención que ninguna otra por parte de toda la cadena de producción y comercialización, habida cuenta del mal conocimiento ampliamente extendido de la calificación de imperecedera que tiene la miel.

Panales con cera nueva estampada, no mezclar los cuadros de extracción con los de alimentación del último invierno, recipientes y utensilios perfectamente limpios antes de la nueva cosecha, con especial cuidado de fisuras donde pueden encontrarse cristales de glucosa, higiene en los apiarios, etc. y almacenamiento, tanto por el productor como por la cadena de comercialización, a una temperatura adecuada..., darán como resultado una menor merma en las cualidades de la miel.

1.8.- CONTROL DE CALIDAD

En la introducción de este trabajo se hace referencia a la "Norma sobre la miel", cuyas definiciones hemos comentado, y a sus características. Así mismo en esta cita se establecen también los factores esenciales de composición y calidad que prácticamente coinciden con los de la Comisión del Codex Alimentario; además se dan las normas al objeto de regular la higiene, etiquetado y métodos de análisis.

El Departamento de Agricultura Norteamericano (U.S.D.A.) establece siete categorías de color, según el comparador de Brice. El color de la miel no es un factor de calidad, sino que condiciona sus usos.

A la miel se le asigna uno de estos cuatro grados de calidad: U.S. Grade A o U.S. Fancy, U.S. Grade B o U.S. Choice, U.S. Grade C o U.S. Standard y U.S. Grade D o Substandard, por evaluación de su contenido en sólidos (humedad máxima del 18,6% para los grados A y B, 20% para el C y sin especificar para el D). La limpieza está especificada en los grados U.S.D.A. como: será la miel por lo menos tan libre de defectos que habiendo pasado por un tamiz N° 80 (grade A), N° 50 (grade B), N° 18 (grade C) no dejen residuo apreciable realizando este ensayo a temperatura inferior a 54,4°C y a una presión de filtración especificada. El sabor y aroma son también tenidos en cuenta.

Nuestra legislación requiere un máximo de sólidos insolubles en agua de 0,5% para la miel prensada y de 0,1% en las demás.

El sabor es juzgado subjetivamente, aunque Merz en 1963, propuso que el examen GLC del extracto etéreo proporciona un procedimiento simple para la valoración objetiva del sabor en la miel. Este autor encontró paradójicamente, que el pico del hidroximetilfurfural domina en ensayos de mieles de sabor satisfactorio y es un componente menor en aquellas de sabor insatisfactorio.

En fin, el contenido en agua, de azúcares, acidez, cenizas, hidroximetilfurfural e índice de diastasas son parámetros imprescindibles en el control de calidad de la miel.

Al ser la diastasa la enzima más resistente al calor, el ensayo para la misma debe efectuarse para aquellas mieles destinadas a países que exijan un mínimo en ésta, así como para aquellas que su uso requiera que sean destruidas.

Para defenderse de sustituciones mediante otros jarabes han de efectuarse la prueba del resorcinol o la

determinación del hidroximetilfurfural, para jarabes ácidos invertidos, y las pruebas de la A.O.A.C. para jarabes de cereales basados en la cromatografía en columna y de capa fina. Muestras con un contenido de hidroximetilfurfural superior a 20 mg/100 g deberán considerarse sospechosas. La cromatografía en capa fina se empleará en la investigación de glucosa comercial. Una prueba definitiva para la adulteración de la miel con jarabe de cereales fue puesta a punto por White y Doner (1978), incluyendo el nuevo jarabe de cereal con alto contenido en fructosa, basado en las diferencias C^{13} - C^{12} en la muestra.

También se han dictado normas para los grados y tipos de miel en panal. Para la miel en trozo de panal estos son U.S. Super o Fancy, U.S. Nº 1, U.S. Nº 1 color mezclado, U.S. Nº 2 e inclasificado. Los grados para la miel de panal de cuadro poco profundo, de trozo de panal envuelto, y de trozo grande envasado en lata o vidrio son U.S. Super, U.S. Nº 1 y sin clasificación. Los factores de calidad para determinar los grados respectivos son aspecto de las selladuras, presencia de granos de polen, uniformidad de la miel, adhesión del panal al trozo, ausencia de granulación, presencia de melaza y peso. Según esta reglamentación la miel destinada al comercio mayorista debe de ser de calidad Fancy o grado Nº 1.

1.9.- OBJETO DEL TRABAJO

Una vez explorada la problemática de la miel, por nuestra parte nos proponemos estudiar diferentes métodos para cada parámetro al objeto de establecer los más adecuados en cuanto a su precisión y exactitud.

En otro orden de cosas, se pretende encontrar los valores promedios y amplitud (tipificación) de las mieles de Galicia para lo que se han utilizado 91 muestras naturales y su comparación con 24 manufacturadas, buscando una justificación al alto precio con que se cotiza la miel española.

2.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DE LOS
METODOS ANALITICOS.



2.1.- COLOR Y TURBIDEZ

El color ha sido estudiado por diversos autores basándose en escalas de colores patrones y usando aparatos para ello.

Brice, B.A. y col. (1956) introdujeron un método que actualmente es oficial en la A.Q.A.C. (1980).

En 1956 idearon un sistema de clasificación del color de la miel que sustituía al clasificador de Pfund, admitido oficialmente por el U.S.D.A. en 1925. Tanto los aparatos como el procedimiento son descritos en los apartados 3.1.1.2 y 3.1.1.3 de este trabajo. En éste la turbidez es estimada en tres grados con suspensiones de tierras de diatomeas.

Rivera, M.D. (1964) cita en su trabajo que numerosas asociaciones de apicultores usan un método que emplea el aparato llamado "meloscopio universal". Consiste en una botellita, siempre de la misma capacidad, a la que acompañan quince bolitas numeradas, representando cada una un color. Las bolitas pares representan los colores tipo y las impares los tonos intermedios. Para clasificar la miel con el meloscopio se llena el recipiente y se compara con la bolita cuyo contenido resulte similar o idéntico al de la miel y entonces se asigna el número de la misma. Los colores corresponden al "blanco" (mejor incoloro) del 1 al 4, dorado del 5 al 9 y oscuro del 10 al 15.

Sanz, B. y Triguero, A. (1970) determinaron el color usando el clasificador de color adoptado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, de acuerdo con la técnica de Brice. En caso de muestras granuladas, se licúan previamente en baño María a 60°C.

Root, A.I. (1976) cita diversos métodos:

- Usando varios patrones de color para indicar los matices de las diversas mieles, pero estos patrones se decoloran con el tiempo y se vuelven prácticamente inútiles.

- Utilizando cristales de anteojos con los diferentes colores de la miel, contrastándolos con botellas de miel, pero los cristales que no se decoloran eran caros y difíciles de conseguir.

- Finalmente describe el comparador colorímetro de Pfund, que da el matiz exacto de cualquier miel.

El comparador colorimétrico de Pfund consta de una cubeta alargada en forma de prisma triangular, en la cual se vierte la muestra de la miel, para luego ser comparada con un prisma de vidrio color ámbar, colocado a la inversa. Como el prisma de vidrio varía de espesor de un extremo a otro, correlativamente variará la intensidad del color; en la porción más gruesa del prisma, el color será ámbar más oscuro y viceversa, en el otro extremo el matiz será casi incoloro con un ligero tono amarillento. Entre ambos extremos se presentan todos los matices del ámbar, dependiendo el color elegido del punto del prisma en que se hace la comparación.

Para encontrar el tono exacto de la miel se observan los dos prismas simultáneamente a través de una ranura o ventanilla vertical; el prisma se mueve por medio de una cremallera manejada con un tornillo. La escala va graduada en mm.

White, J.W.Jr. (1978) señala una correspondencia entre el método del U.S.D.A., el colorímetro de Pfund y un método basado en la medida de la absorbancia a 560 nm en cubetas de 3,15 cm de espesor para soluciones caramelo (miel) glicerinadas frente a un blanco conteniendo glicerina.

Simal, J., Huidobro, J.F. y Araquistain, J.L. (1981) estudiaron el procedimiento americano y el de Barbier y Valin, proponiendo un método espectrofotométrico de evaluación objetiva del color, empleando para ello cubetas de 1 cm de espesor, lo que permite clasificar las mieles en función de su absorbancia neta ($A_{560} - A_{800}$) sirviendo al mismo tiempo ésta última absorbancia para evaluar la turbidez. Los diferentes matices de intensidad de color de las mieles comerciales son asignados a

las mismas según la escala de Barbier y Valin.

Por último queremos mencionar que la medida de color se hace internacionalmente siguiendo el método de la Commission Internationale de l'Eclairage (C.I.E.), por medio de las llamadas coordenadas tricromáticas. Así en España la medida del color en vinos se hace siguiendo dicho procedimiento (B.O.E. nº 246 de 14 de Octubre de 1981).

En nuestro trabajo hemos considerado la posibilidad de tipificar el color en función de la diferencia de absorbancias ($A_{560} - A_{720}$). La absorbancia a 720 nm es utilizada por otros autores entre los que se encuentra Rodier, J. (1966) para evaluar la turbidez en aguas ya que a esta longitud de onda los tonos amarillentos no tienen incidencia.

2.2.- ACIDEZ (pH, ACIDEZ LIBRE, LACTONICA Y TOTAL), E INDICE DE FORMOL.

Fiehe, J. y Kordotzki, W. (1928) indican que en mieles naturales el pH promedio es de 3,9 y en mieles artificiales de 3,2; por lo que mieles con promedios inferiores a 3,8 son indicativos de adulteración.

Nelson, E.K. y Mottern, H.H. (1931) distinguen entre ácidos no volátiles, los cuales precipitan con subacetato de plomo y lavan con alcohol de 50; de los ácidos volátiles, que someten a una destilación en corriente de vapor de agua, valorándolos posteriormente.

Casares, G. y Casares, R. (1954) realizan la determinación del índice de formol después de evaluar la acidez total empleando la fenolftaleína como indicador.

Valenciano, O.A. (1954) y Rivera, M.D. (1964) valoran la acidez total por un procedimiento similar al anterior, al igual que Comenge, M. (1964).

Taylor, W.H. (1957) evalúa varias modificaciones del índice de formol aplicado a hidrolizados de proteínas, y encuentra que la neutralización previa de la mues-

tra a pH 9,0 da puntos finales prematuros, mientras que neutralizaciones preliminares a pH 7,0 proveen mayor exactitud en los métodos volumétricos.

El Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974), describe un método potenciométrico para la evaluación del pH, acidez libre, lactónica y total e índice de formol en la miel. Llevan la disolución hasta pH 7 valorando así la acidez total en un minuto de tiempo, mientras que para la acidez lactónica lleva la muestra a un pH 9,8 en sesenta segundos y el índice de formol lo realizan a pH 8,0.

Nuestra Norma sobre la miel (B.O.E. 1975, 1976) sólo evalúa el pH y la acidez total realizando la neutralización hasta pH 8,3.

Sanz, B. y Triguero, A. (1970) y White, J.W.Jr. y Doner, L.W. (1978) siguen el método de la A.O.A.C. en sus ediciones de 1970, 1975 y 1980 consistente en disolver una cantidad de miel en agua destilada libre de anhídrido carbónico, valorar su acidez libre a pH 8,5, añadir un exceso de hidróxido sódico y establecer su acidez lactónica llevando la disolución hasta un pH 8,3. No incluyen el índice de formol.

White, J.W.Jr. (1978) indica la problemática de esta valoración debido a que el punto final se desvanece ya que la gluconolactona se hidroliza.

Para Montes, A.L. (1981) esta determinación puede verse complicada como resultado de haberse sometido la muestra al calor lo que daría lugar a la deshidratación de las hexosas, formación de hidroximetilfurfural y a su vez a la descomposición de éste en ácido levulínico y fórmico, pudiendo este último determinarse por cromatografía.

En nuestro caso hemos utilizado el procedimiento potenciométrico de la A.O.A.C. (1980), incluyendo el índice de formol.

2.3.- CENIZAS

Schuette, H.A. y Remy, K. (1932) enumeran los métodos de análisis y relacionan las cenizas con el color y otros componentes minoritarios.

La determinación de este parámetro se hace básicamente por el procedimiento de incineración.

En la preparación de la muestra antes de la calcinación para evitar el rebosamiento y sus consiguientes errores, los autores siguen diferentes variantes. Así, Comenge, M. (1964) somete la muestra a una desecación a 110°C antes de su incineración. Sanz, B. y Triguero, A. (1970) siguen el método de la A.O.A.C. (1970) que realiza la desecación mediante la acción de una lámpara infrarroja. El Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974) recoge una modificación en la que, para facilitar la incineración, se añade una cantidad conocida de nitrato de lantano.

En nuestra legislación se contempla (Aptdo. 6-5, B.O.E. 337/1975) el uso de lámpara de rayos infrarrojos para carbonizar la muestra antes de introducirla en el horno, e incluso en caso necesario puede añadirse unas gotas de aceite de oliva para evitar la formación de espuma, lo que trae consigo errores en su determinación.

Tong, S.G. y otros (1975) consideran el análisis de los elementos minerales de las cenizas de la miel como indicadores de la polución.

Se ha utilizado en la parte experimental de este estudio la calcinación directa, previa desecación bajo rayos infrarrojos, de la muestra.

2.4.- CONTENIDO EN AGUA

El contenido en agua de la miel ha sido estudiado por diversos métodos, entre los que destacan: determinación del índice de refracción, medida de la densidad,

dsecación y Karl Fischer.

2.4.1.- Métodos basados en la medida del índice de refracción.

Valenciano, O.A. (1954) siguiendo el método de Chataway, determina el índice de refracción de la muestra a 25°C mediante el refractómetro de Abbe-Zeiss o con el refractómetro de inmersión. Este valor permite establecer el porcentaje de agua.

Inicialmente Pearson, D. (1954), más tarde Sanz, B. y Triguero, A. (1970) y posteriormente Quilez, M.A. y Barrado, A. (1976) siguen el método señalado en la A.O.A.C. (1980), basado en medir el índice de refracción de las muestras de miel mantenidas a 20°C con el refractómetro de Abbe y, a partir del dato obtenido, calculan el porcentaje de agua con la tabla de Chataway, ampliada por White y col. (1962). Este método es el seguido en la Norma sobre la Miel (B.O.E. 1975).

El Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974) determina el índice de refracción a 40°C, y a partir de este valor calcula el contenido en materia seca. Por diferencia se podrá conocer el contenido en agua.

2.4.2.- Métodos basados en la determinación de la densidad.

Valenciano, O.A. (1954) sigue el método de Averbach y Borries que se basa en determinar la densidad de una solución de miel al 20% (p/v) mediante la balanza de Mohr-Westphal, obteniéndose luego el porcentaje de agua en una tabla.

Casares, R. (1967) utiliza la medida del peso específico de una solución de miel al 20% (p/v) a 15°C y valiéndose de las tablas de Windisch, deduce según la densidad obtenida, la cantidad de extracto seco y por dife-

rencia a 100, el contenido en agua. También este mismo autor utiliza métodos en los que determina la humedad mediante la densidad d_{20}^4 (es decir, a 20°C, estando el agua a 4°C) o el índice de refracción a 40°C.

Indica que estos métodos dan resultados que no coinciden, siendo necesario mencionar en los dictámenes cuál se ha elegido.

Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974) usa un método picnométrico determinando la densidad de una solución de miel al 20% (p/v). Así calcula el contenido en materia seca de una manera aproximada y por diferencia el porcentaje de agua.

Root, A.I. (1976) cita dos métodos:

Uno que consiste en poner la muestra de miel a unos 20-22°C durante 24 horas, luego medirá un litro en un recipiente homologado. Se pesa el litro de miel, siempre a la temperatura indicada, descontándose el peso del recipiente se podrá obtener la densidad o peso específico. Luego se busca el porcentaje de agua en unas tablas.

Otro método es el denominado "prueba de la burbuja". Para éste se pondrá atención en que la temperatura de las mieles ensayadas sea la misma. Las muestras de miel se colocan en frascos de vidrio de un tamaño determinado, dejando debajo del tapón un hueco de aire. Al invertir el frasco, la burbuja del aire ascenderá lenta o rápidamente, dando esa observación una idea de la densidad de la miel. Cuando se compara una miel de contenido en agua desconocido con otra del mismo origen y de la cual se conoce el porcentaje de agua, por el tamaño de la burbuja y su velocidad de ascenso se podrá formar una idea sobre la densidad de la miel. Como se observa es un método grosero, pero de gran utilidad al apicultor.

2.4.3.- Métodos gravimétricos

2.4.3.1.- Por desecación directa

Villavechia, V. (1944) y Bayona, J. (1956) taran una cápsula de porcelana y una varilla de vidrio, colocan en la cápsula la miel y la diluyen con un poco de agua destilada, concentran a baño María y desecan el residuo en estufa a 105-110°C, hasta peso constante.

Jerez, R. (1963) deseca la miel a 105°C hasta peso constante y de forma similar Comenge, M. (1964) empleando arena y realizándola a 110°C.

Breteau, P. (1907), Kling, M.A. (1922), Valenciano, O.A. (1954), y Taveira, M. y Bethlem, M.L. (1958) parten de una solución de miel al 20% (p/v).

2.4.3.2.- Desecación a vacío y temperatura menor de 70°C

Una importante modificación de estos métodos es la que describen Leach, A.E. y Winton, A.L. (1909), que consiste en usar una estufa de vacío a una temperatura de 65-70°C y con una presión no por encima de 100 mm de Hg (la fructosa se descompone a temperaturas superiores). Esta técnica se recoge actualmente en la A.O.A.C. (1980) con la variante de usar 50 mm de Hg como máximo. Viene a indicar que los autores anteriores que no han tenido en cuenta este detalle obtenían valores de contenido en agua superiores a los reales.

Manuel Suisse del Denrées Alimentaires (1974) también utiliza el método de Averbach y Borries modificado. El procedimiento consiste en añadir una cantidad de solución de miel, previamente pesada, a un tubo en U, donde hay fragmentos de porcelana porosa. Después se lleva a la estufa de vacío, a una temperatura aproximada de 65°C y en corriente de aire seco (para ello se usa cloruro cálcico) hasta peso constante. Así se obtiene el residuo y por diferencia el contenido en agua.

2.4.4.- Método de Karl-Fischer

White, J.W.Jr. (1978) cita éste método en una revisión bibliográfica.

Simal, J., Huidobro, J.F. y Araquistain, J.L. (1981) comparan el método refractométrico, el método de desecación a vacío y el método de Karl-Fischer en 24 muestras comerciales. Se realiza simultáneamente un estudio de su precisión y exactitud. Como conclusión del trabajo proponen como método para la evaluación del contenido en agua, una variante del método químico de Karl-Fischer, consistente en el vertido de la miel, pesada por diferencia, sin necesidad de su disolución en metanol dado que el método es preciso, exacto y rápido.

En este trabajo además se comprobará el reactivo Reaquant, cuyas ventajas sobre el de Karl-Fischer son anunciados en boletines técnicos de la casa comercial Baker.

2.5.- AZUCARES

2.5.1.- Métodos polarimétricos

Casares, R. (1967) utiliza un método polarimétrico combinado con el método reductométrico de Bertrand, antes y después de la inversión; emplea como clarificante hidróxido de aluminio y sugiere como método de inversión las técnicas de Herfeld y Clerget.

Lees, R. (1968) sugiere entre los parámetros para el control de la miel la rotación óptica de la disolución al 10% (p/v).

Hart, F.L. y Fischer, H.J. (1977) usan la polarimetría directa y tras la inversión calculando el contenido de sacarosa en la miel mediante fórmulas adecuadas.

White, J.W.Jr. (1980) utiliza la polarimetría, jun-

to con el contenido en agua, glucosa, fructosa, etc. como parámetros para evaluar la adulteración de la miel.

2.5.2.- Métodos químicos reductométricos

Aunque cabría distinguir entre métodos que utilizan las sales cúpricas y los que utilizan yodo en medio alcalino, estos últimos para evaluar la función aldehído de las hexosas, en esta breve revisión se citan conjuntamente por orden cronológico.

Averbach, F. y Bolander, E. (1924) utilizan el método de Willstaeter para la valoración de glucosa, mediante la solución de yodo en medio alcalino. Este procedimiento es también utilizado por Jerez, R. (1963) entre otros.

Villavechia, V. (1944) y Salazar, E. (1947) utilizan un método similar al de Lane Eynon, empleando como clarificante el subacetato de plomo.

Jerez, R. (1963) emplea el método reductométrico de Lehman-Schoorl, para los azúcares reductores y la sacarosa.

Montes, A.L. (1966) emplea el reactivo de Shaffer-Somogyi previa oxidación de la glucosa por el hipoyodito, valorando conjuntamente glucosa y "maltosa aparente", lo cual tiene interés en combinación con el método de separación en cromatografía en columna.

Casares, R. (1967) incluye el método reductométrico de Bertrand y en ediciones anteriores el método de Willstaeter para la glucosa.

El método oficial español (B.O.E. 1975) se basa en una modificación en el método de Lane-Eynon que permite calcular el contenido de azúcares reductores y sacarosa aparente.

Hart, F.L. y Fischer, H.J. (1977) también emplean un método químico que utiliza la solución de Fehling lle-

vando a cabo diferentes modificaciones para evaluar el cobre reducido: pesada directa, electrodeposición, Leman-Schoorl, Bertrand, etc.

La A.O.A.C. (1978) suprime el método "Official Final Action" para el cálculo de la sacarosa basado en la combinación de los métodos químicos, ya sean Munson-Walker o Lane-Eynon, con los métodos polarimétricos.

2.5.3.- Métodos gravimétricos para la determinación de dextrinas en la miel.

Kling, M.A. (1922) precipita las dextrinas con alcohol y las cuantifica gravimétricamente, corrigiendo el resultado con la resta de azúcares reductores y sacarosa englobados en el precipitado convenientemente desecado.

Villavechia, V. (1944) y Jerez, R. (1963) precipitan las dextrinas con disolución de tanino.

El B.O.E. (1975) y la A.O.A.C. (1980 y anteriores ediciones) siguen un procedimiento similar al de Kling, M.A. (1922) que básicamente es el realizado por nosotros.

2.5.4.- Métodos cromatográficos

Duisberg, H. (1967), Sanz, B. y Triguero, A. (1970) White, J.W.Jr. (1978, 1979a) y la A.O.A.C. (1980 y ediciones anteriores) entre otros utilizan la cromatografía en columna para lograr la separación de monosacáridos, disacáridos y azúcares superiores, y posteriormente combinando el método del hipoyodito y el de Shaffer-Somogyi estableciendo el contenido en glucosa, fructosa, sacarosa, "maltosa" y azúcares superiores.

El Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974) utiliza la cromatografía sobre papel circular para establecer el contenido glucídico de la miel, logrando sepa-

rar de fuera a dentro glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y melecitosa. En el origen se encuentran oligosacáridos no identificados.

Doner, L.W. y col. (1979) con el empleo de la cromatografía gas-líquido y utilizando colestano como patrón interno analizan 115 muestras de miel, y 21 de jarabes de maíz de alto contenido en fructosa, y en función de la relación maltosa-isomaltosa ponen de manifiesto la adulteración.

White, J.W.Jr., Kushnir, I. y Doner, L.W. (1979) comparan el anterior método con el que implica la cromatografía en columna y el de capa fina, observando la idoneidad de éste último. Este método es adoptado como "Official First Action" en la A.O.A.C. (1980).

White, J.W.Jr. (1979a) propone un método que combina el de la cromatografía en columna tradicional con el empleo de la glucosa oxidasa-peroxidasa, invertasa y la pesada del extracto seco de los distintos eluatos.

Kushnir, I. (1979) utiliza la fracción tercera de la cromatografía en columna (fracción de oligosacáridos) y la somete a una separación en silicagel en capa fina, para poner de manifiesto muestras de miel adulteradas.

White, J.W.Jr. (1978) en un importante estudio de recopilación sobre la miel realiza una comparación de los métodos gas-cromatográficos (GLC) y de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía en columna tradicional. Considera que el método GLC es de valor intermedio entre la HPLC y la de columna.

Ethean, J. y Funderburk, W.C.Jr. (1977) emplean la cromatografía líquida de alta resolución para evaluar la sacarosa en la miel, encontrando valores entre 0.63 y 8,44%. También determinan fructosa, glucosa y maltosa.

White, J.W.Jr. (1979a) utilizando un método análogo al de los anteriores. Determina glucosa, fructosa, y sacarosa, no encontrando discrepancias desde el punto de vista estadístico con el oficial por lo que sugiere su adopción como método "Interin Official First Action"

incluyéndose éste en la A.O.A.C. (1980).

La A.O.A.C. (1980) cuando el azúcar a determinar es la sacarosa propone una variante del método de la cromatografía en columna, en el que emplea glucosa oxidasa-peroxidasa e invertasa para cuantificar ésta.

2.5.5.- Métodos enzimáticos

Boehringer-Manheim (1976) determina glucosa, fructosa y sacarosa basándose en las reacciones enzima-sustrato, en la miel y otros alimentos.

Este método con ligeras modificaciones ha sido seleccionado por nosotros en el presente trabajo.

Moreno, F. y de la Torre, M.C. (1979) describen la valoración de glucosa y fructosa enzimáticamente como método general de análisis de alimentos.

2.5.6.- Otros métodos

Dubois, M. y col. (1956) establecen el contenido en azúcares en la miel por un método colorimétrico, basado en que los azúcares incluyen grupos reductores libres o potencialmente libres que dan un color naranja-amari-llento al tratarlos con fenol y sulfúrico concentrado.

White, J.W.Jr. (1977) determina la sacarosa en miel sin separación preliminar eliminando la glucosa mediante glucosa oxidasa-catalasa y estableciendo la sacarosa en función de la glucosa obtenida por la acción de la invertasa mediante reacción coloreada con la o-tolidina a 520 nm.

White, J.W.Jr. y Doner, L. (1978) ponen de manifiesto la adulteración con jarabes de cereal de alto contenido en fructosa mediante la relación C^{13}/C^{12} .

Susumu, Honda y col. (1980) determinan fluorométri-

camente los azúcares reductores con 2-cianoacetamida, con la que dan una intensa fluorescencia en tampón borato.

En el estudio de las mieles utilizaremos el método reductométrico para la evaluación de azúcares reductores y sacarosa aparente, métodos enzimáticos para la determinación de glucosa y fructosa; pudiendo determinarse de esta forma la maltosa aparente por los cálculos adecuados y método gravimétrico y reductométrico para el contenido en dextrinas.

2.6.- ENZIMAS

En este capítulo se incluyen los métodos utilizados fundamentalmente para la determinación de la actividad de α y β amilasas o diastasa que suele estar incluido en los parámetros para control de calidad de la miel. También se hace una breve mención de la α glucosidasa (sacarasa o invertasa) y la fosfatasa.

Los métodos para la valoración de la glucosa oxidasa y la catalasa pueden consultarse en el trabajo de White, J.W.Jr. (1978).

Gunther, F. y Burckhart, O. (1967) describen la existencia en la miel de una fosfatasa ácida tipo fosfomonoestearasa, con un óptimo de actividad para un pH comprendido entre 4.9 y 5.3, así como el método para su determinación por incubación con p-nitrofenilfosfato.

La sacarasa ha sido determinada entre otros por Hadorn, H. y Zürcher, K. (1966) mediante un método polarimétrico. El procedimiento es recogido por el Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974).

Siegenthaler, U. (1977) describe un método para el análisis de la actividad de la sacarasa basado en la medida espectrofotométrica del p-nitrofenil liberado del sustrato p-nitrofenilalfaDglucopiranosido por la acción de la α glucosidasa.

Entre las numerosas publicaciones que se han referido a la determinación de las diastasas, por nuestra parte hemos manejado las de:

Lampitt, L.H., Hugues, E.B. y Rooke, H.S. (1931) que establecen las relaciones de la actividad diastásica con respecto al pH, temperatura y la cantidad de los distintos sustratos con el tiempo. Pudiendo establecer sobre esta base un medio de control de este alimento en cuanto a falsificaciones y a su calentamiento.

De una forma cualitativa se incluye en las obras de Villavechia, V. (1944) y Montes, A.L. (1981) entre otros autores.

Gontarki, H. (1954), Schade, J.E.; Marsh, G.L. y Eckert, J.E. (1958) y Hadorn, H. (1961) emplean un método similar, que es el fundamento de los métodos oficiales, tanto de la A.O.A.C. (1975) y método oficial español (B.O.E. 1975). Talpay, B. (1977) establece gráficamente el índice de diastasas. Recientemente se ha introducido una modificación del método consistente en el empleo de un almidón normalizado, que hace innecesario el cálculo del índice de azul, A.O.A.C. (1980).

White, J.W.Jr. (1978) recoge el método de Edwards, R.A. y col. que han comparado un procedimiento basado en el empleo del sustrato coloreado "Cibacron Blue" por determinación de su absorbancia a tiempo fijo, con el del Codex. El método fué puesto a punto anteriormente por Klein, B.; Foreman, J.A. y Searcy, R.L. (1969).

Análogo procedimiento sirve de base para que Siegenthaler, U. (1975) determine α amilasa en la miel.

En nuestro caso, como se indicará en la parte experimental, hemos seguido el método oficial español (B.O.E. 1975) empleando la línea de tendencia.

2.7.- HIDROXIMETILFURFURAL

Fiehe, J. (1929) determina el azúcar invertido con ayuda de una solución clorhídrica de resorcina, que da un color rojo cereza sobre el extracto etéreo de la miel problema. También lo realiza por precipitación mediante la floroglucina.

Weis, F. (1930) trata el extracto etéreo con una solución acética de hidrazina dando un compuesto insoluble en agua y éter de petróleo. El precipitado, tras las operaciones adecuadas, es pesado y en función de éste se establece la cantidad de hidroximetilfurfural.

Brannsdorf, K. (1932) compara la sensibilidad de las pruebas de la floroglucina y del resorcinol dando ésta última como más sensible.

Rudolph, P. y Barsch, H. (1932), Moreaux, B. (1936) y Mateu, G. (1938) siguen la reacción de Fiehe con pequeñas variantes y estudian su sensibilidad en cuanto a las mieles calentadas y adulteradas.

Winkler, O. (1956) efectúa la determinación cuantitativa de este componente por la reacción coloreada que se produce en presencia de ácido barbitúrico y p-toluidina, mediante su espectro de absorción.

Gautier, J.A.; Renault, J. y Álvarez, J. (1961) revisan los métodos seguidos hasta entonces y proponen la reacción de Fiehe, J. y la cromatografía en papel como las técnicas más sensibles.

Tanto Piette, A.M. (1965), Duisberg, H. (1967) y Montes, A.L. (1981) considera que los mejores resultados son los obtenidos por el método cualitativo de Fiehe modificado por Gautier, J.A. y como cuantitativo el de Winkler, O. Este último modificado es considerado como método oficial en España (B.O.E. 1975) y figura en numerosas obras como la del Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (1974). El de Fiehe, J. sigue figurando en obras como la A.O.A.C. como método para investigar la adición de azúcar invertido comercial, no siendo concluyente.

Dhar, A.K. y Roy, B.R. (1972) presentan un método para la determinación de hidroximetilfurfural en la miel que incluye el uso de una columna de adsorción en carbón activo.

White, J.W.Jr. (1979b) y White, J.W.Jr.; Kushnir, I. y Doner, L.W. (1979) proponen un método espectrofotométrico para la valoración de hidroximetilfurfural en miel por lectura de las absorbancias a 284 y 336 nm empleando como agentes clarificantes las soluciones Carrez y para conseguir el blanco en la porción alícuota tratan la solución de miel clarificada con una de bisulfito sódico al 0.20% (P/V) de grado técnico, que será al 0.10% (P/V) previa dilución del problema, cuando se trate de mieles con alto contenido en hidroximetilfurfural. Este método considerado como "Official First Action" ha sido ratificado por la A.O.A.C. (1982).

White, J.W.Jr. y Siciliano, J. (1980) realizan la determinación de hidroximetilfurfural a fin de establecer la adición de azúcar invertido como adulteración fijando la cuantía del mismo, estableciendo la relación con otros parámetros.

Jeuring, H.J. (1980) aplica la cromatografía de alta resolución a la determinación de este dato y los resultados obtenidos son relacionados con el método de Winkler, O. encontrando que existen diferencias estadísticamente significativas. Las muestras con un contenido menor de 40 mg/kg no dan respuesta adecuada en el método de Winkler.

En este trabajo se ha probado el método de Winkler, O. (1955), y el de la A.O.A.C.



3.- PARTE EXPERIMENTAL





3.1.- DETERMINACION DEL COLOR Y DE LA TURBIDEZ

En la determinación del color y de la turbidez en la miel varios métodos han sido ensayados y evaluados conjuntamente.

3.1.1.- Método oficial en la A.O.A.C.

3.1.1.1.- Fundamento

Clasifica la miel por el color empleando el comparador propuesto por Brice y col., y empleado por el U.S.D.A. desde 1925.

3.1.1.2.- Aparatos

- Recipientes. Botellas francesas cuadradas, con tapón de rosca, vidrio claro 1'5 x 1'5 pulgadas y contenido $2/32$ de onza (Virtis Co; Phoenix Precision Instrument Div., Rt 208, Gardiner, NY 12525).

- Comparador. Todas las cajas de metal cada una de 8x2x3 pulgadas, divididas por separaciones delgadas en compartimentos cuadrados, cada una de ellas con dos ventanas, una delante y otra detrás, de 1'2 pulgadas cuadradas. Los tres patrones de cristal más claro (Water White, Extra White y White) están montados en una de las cajas de comparadores en posiciones 1, 3 y 5. Los tres patrones más oscuros (Extra Light Amber, Light Amber y Amber) están montados en un segundo comparador similar al anterior. Los recipientes señalados en el apartado a) llenos con agua se colocan detrás de los cristales patrones. Con mieles turbias se colocarán los recipientes llenos con tierra de diatomeas designados como Cloudy 1, Cloudy 2 y Cloudy 3 que contienen 100, 200 y 400 mg/l respectivamente.

- Cristales patrones. Usa cristales coloreados seleccionados, contrastados y normalizados por el U.S.D.A. que corresponden con los patrones coloreados para la miel.

Todo el conjunto fue adquirido a la Virtis Co.

3.1.1.3.- Procedimiento

Colocar los blancos o las suspensiones Cloudy detrás de los cristales patrones en las posiciones 1, 3 y 5 de los comparadores. La muestra libre de granulación en uno de los recipientes que debe estar limpio y seco. Colocar el comparador a una distancia conveniente del ojo y mirarlo con luz difusa (luz del norte o de cielo nublado, luz difusa de una lámpara de wolframio o bien luz blanca de un tubo fluorescente). Mover la muestra de compartimento en compartimento, intercambiando los blancos con las suspensiones Cloudy si es necesario. Determinar la clasificación como sigue: Si el color es igual al Water White o menor en color clasificarlo como Water White; si posee un color apreciablemente más intenso que el color Water White, pero menos que el Extra White clasificarlo como Extra White, etc. Si es más oscura que el Amber clasificarla como Dark Amber. El matiz es un atributo de color en la clasificación.

3.1.2.- Método de Barbier y Valin

3.1.2.1.- Fundamento

Connotan que Zander utiliza una escala de cinco colores principales, y a su vez cada uno de ellos dividido en tres colores secundarios dando como resultado una amplia gama de 15 colores.

El empleo del caramelo como patrón tiene inconvenientes en su preparación, ya que en ésta la temperatura

es un factor crítico que puede modificar el color.

Como solución Barbier y Valin emplean un procedimiento basado en comparar visualmente el color de la miel frente a una escala de disoluciones de yodo y en evaluar la turbidez de la muestra mediante una escala de sulfato de bario.

3.1.2.2.- Reactivos

- Soluciones de yodo de concentraciones comprendidas entre 19,5 mg/l y 25400 mg/l.
- Sulfato de bario.

3.1.2.3.- Procedimiento

Clasifica la miel comparándola visualmente frente a las disoluciones de yodo eliminando la interferencia de la turbidez situando detrás del tubo patrón de color, el necesario de la escala de turbidez, previamente agitado.

Asigna el color de la miel en una escala que va desde el 13 al 44 y que corresponde a los colores "blanco", amarillo, dorado, ámbar y oscuro, cada uno de ellos divididos en tres tonos intermedios que se distinguen por los números 1, 2 y 3.

3.1.3.- Método de J. Simal, J.F. Huidobro y J.L. Araquistain

Si bien Barbier y Valin proponen un patrón más estable y obtienen una escala de color más amplia, su método adolece de dos serios inconvenientes que son por una parte su falta de objetividad y por otra la no eva-

luación correcta de la turbidez basada en la escala de sulfato de bario.

A resultas de tales consideraciones hemos sugerido la aplicación de un método espectrofotométrico, dando los resultados con relación a la escala de Barbier y Valin.

3.1.3.1.- Fundamento

Este método pretende establecer "el color" de la miel mediante la absorbancia neta de las lecturas que presenta la muestra a 560 y 800 nm.

La absorbancia a 560 nm ha sido elegida basándose en un trabajo de White (1978) en el que encuentra una relación lineal entre dicha absorbancia de soluciones caramelo-glicerina (miel) frente a glicerina, y los comparadores tanto de la A.O.A.C. y de Pfund; y en el propio conocimiento del hecho de que a longitudes de onda más altas la curva presentaba modificaciones.

La absorbancia a 800 nm es utilizada para descontar de aquella la turbidez.

3.1.3.2.- Reactivos

- Disolución 0'1 N de yodo a partir de ampolla Merck Art. 9910. Por dilución se prepararán disoluciones intermedias.

3.1.3.3.- Material y aparatos

- Espectrofotómetro Hitachi modelo 100-60, ultra-violeta-visible, de doble haz.
- Cubetas de 1 cm de espesor apareadas.

- Registrador (no es imprescindible para el método propuesto).

- Centrífuga Heraeus Christ, modelo piccolo.

- Material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.1.3.4.- Procedimiento

Tanto en las soluciones de yodo como en las muestras convenientemente licuadas y centrifugadas se determinan las absorbancias a 560 y 800 nm en cubeta de 1 cm frente a agua destilada.

La relación entre la absorbancia neta y los gramos de yodo/litro vino dada por la ecuación:

$$g \text{ de yodo/litro} \times 0'395732 - 0'003912 = \text{Absorbancia neta}$$
$$r = 0'999987$$

Por lo tanto la absorbancia neta encontrada en la muestra estará relacionada con el color que tendría una solución de yodo de determinada concentración que a su vez corresponde a un valor de la escala de Barbier y Valin, y a un color tipificado por la escala de Zander.

Actualmente la corrección de la turbidez la efectuamos a 720 nm pues hemos observado en algunas muestras que éste es el punto más bajo de su espectro visible.

3.1.4.- Aplicación del método de la "Commission Internationale de l'Eclairage" al color en la miel.

3.1.4.1.- Fundamento

Como es sabido el Boletín Oficial del Estado (1981) incluye un método para la estimación de color en vinos.

Este método, valiéndose de las medidas espectrofotométricas objetivas calcula las coordenadas triestimulares según la Norma de la "Commission Internationale de l'Eclairage" (C.I.E.), lo que permite como veremos aplicarlo a la miel.

3.1.4.2.- Material y aparatos

Los mismos que en el apartado 3.1.3.3.

3.1.4.3.- Procedimiento y cálculos

Realizada la toma de muestra como se indica en el apartado correspondiente, se centrifuga la miel y se vierte en la cubeta, utilizando otra como referencia.

Se medirán directamente las transmitancias con el espectrofotómetro a las siguientes longitudes de onda: 625, 550, 495 y 445 nm. Así mismo, al objeto de comparar este método con el anterior se medirán las absorbancias a 560 y 720 nm.

Se calculan las coordenadas (x, y) del punto representativo del color de la miel en el diagrama tricromático de la C.I.E.

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z}$$

$$\text{donde: } X = 0'42 T_{625} + 0'35 T_{550} + 0'21 T_{445}$$

$$Y = 0'20 T_{625} + 0'63 T_{550} + 0'17 T_{495}$$

$$Z = 0'24 T_{495} + 0'94 T_{445}$$

Los valores X, Y y Z expresan las proporciones de colores rojos, verdes y azul que dan por mezcla el color de la miel.

Luminosidad relativa es el valor de Y, expresado

en porcentaje (siendo el negro $y=0$ y el incoloro $y=100$).

Cromaticidad

Para expresar la cromaticidad (longitud de onda dominante y pureza), se recurre al diagrama de cromaticidad, que representa el "locus" de todos los colores del espectro, considerando que a 400 nm corresponde al azul, a 520 al verde y a 700 nm al rojo. El punto 0 a la fuente luminosa utilizada que en nuestro caso, es el iluminante standard 0, que representa la luz de un día medianamente claro y cuyas coordenadas son:

$$x_0 = 0'3101 \text{ e } y_0 = 0'3163$$

Hemos reproducido esta parte del texto porque a pesar de señalar las coordenadas correctamente, el diagrama de cromaticidad que se reproduce, reincide en los errores de años anteriores (Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura 1981) en que se representa a más de 0'35 el valor de x_0 y en consecuencia cualquier medida que pretenda establecerse será errónea.

La longitud de onda dominante se establece mediante el diagrama de cromaticidad, de forma gráfica uniendo con una recta el punto 0 del diagrama con el punto obtenido experimentalmente y representado en él, prolongándola se obtiene el punto intersección al valor buscado.

La pureza se establece por el porcentaje entre la distancia entre el 0 y el punto experimental y el segmento en esa misma recta que va desde el 0 al punto intersección del diagrama (longitud de onda dominante).

3.1.5.- Comentario a los métodos de determinación de color

El primer inconveniente puesto de manifiesto al estudiar el método de la A.O.A.C. fué su falta de objetividad, ya que a la misma muestra le son asignados colores distintos según el analista que determine el parámetro.

La dificultad antes mencionada nos sugirió el desmontar los seis cristales del comparador y examinarlos espectrofotométricamente.

Los cristales no son de la misma naturaleza y en consecuencia aparentemente no pueden mantener proporcionalidad entre el número de orden y su intensidad de color. Abundando en ello diremos que el cristal 6 está constituido por dos colores: el rojo y el humo y el cristal número 1 presenta más absorbancia en recorrido de 800 nm a 560 nm que el número 2; sin embargo sus absorbancias netas ($A_{560} - A_{720}$) para todos los cristales son correlativas según Simal, J.; Huidobro, J.F. y Araquistain, J.L. (1981). En este caso, al establecer la representación entre el número de comparador y la absorbancia neta (Tabla IV) el coeficiente de correlación lineal resultó ser de 0,882; lo cual permitió en su día, al observar la gráfica, pensar en una regresión entre el número de orden y el logaritmo de la absorbancia neta ($A_{560} - A_{720}$). En efecto en estas condiciones el coeficiente de correlación lineal fue de 0'996.

Después de aquella publicación hemos efectuado la lectura de los cristales del comparador visual de la A.O.A.C. según el método de la C.I.E. incluyéndolos también en la Tabla IV.

Análogo tratamiento fue aplicado al método propuesto que efectúa la lectura de la absorbancia neta ($A_{560} - A_{720}$) sirviéndose para ello de soluciones de yodo de distinta concentración. La Tabla V muestra el resumen de los resultados obtenidos.

TABLA IV

Comparador de la A.O.A.C. estudiado por el método de la C.I.E. y el método propuesto.

	Nº de cristal	x	y	Luminosidad relativa	Longitud de onda domin.	Pureza	A neta	Turbidez
Water White	1	0'376	0'404	40'4	573'3	41'0	0'028	0'117
Extra White	2	0'419	0'439	43'9	575'8	69'9	0'097	0'081
White	3	0'472	0'462	46'2	578'5	80'8	0'176	0'103
Extra Light Amber	4	0'529	0'450	45'0	584'2	92'9	0'361	0'127
Light Amber	5	0'627	0'373	37'3	599'1	98'6	0'921	0'279
Amber	6	0'666	0'334	33'4	611'3	98'5	2'000	0'290

TABLA V

Estudio de las soluciones de yodo por el método de la C.I.E. y el método propuesto.

Concentración mg/l	x	y	Luminosidad relativa	Longitud de onda dominante	Pureza	A neta	Turbidez
127	0'378	0'414	41'4	572'4	44'1	0'047	0'003
254	0'430	0'469	46'9	533'8	71'0	0'097	0'003
1270	0'559	0'432	43'2	580'0	95'9	0'482	0'007
2540	0'628	0'372	37'2	599'3	98'6	0'980	0'010

La correlación de los valores de concentración de yodo en mg/l frente a la absorbancia neta es de 0'9999655 y la ecuación de la recta que resulta es: $y = 0'000386x - 0'002989$. La cual permite calcular los valores de absorbancia neta para cada uno de los puntos de la escala de Barbier y Valin (véase Tabla VI).

De otra parte al representar los valores de los resultados de las mieles naturales en el diagrama de cromaticidad (Figura 1), así como los valores de las comerciales, y de las escalas de Barbier y Valin y de la A.O.A.C. (Figuras 2 y 3). Se observa en ambas una aparente correlación que nos ha permitido establecer en la Figura 4 la representación de estos datos enfrentado la longitud de onda dominante frente a la absorbancia neta ($A_{560} - A_{720}$) en ordenadas de todas las mieles. Como puede observarse en esta figura se ha dibujado una nube de puntos que se puede aproximar a una recta que permitiría predecir la longitud de onda en base a la absorbancia neta, cuyo coeficiente de correlación lineal es 0'990 y cuya ecuación es $y = 19'5x + 574'6$.

En cualquier caso sin embargo el color no sería determinado con el mismo rigor que utilizando el método de la C.I.E., por cuanto se pueden encontrar mieles que difieran de las más manejadas en este estudio (en la Bibliografía se citan algunas de color rosa, de otros tonos, etc.) y porque además como se observa en el diagrama de las Figuras 1 y 2 se han encontrado mieles con igual longitud de onda dominante y distinta pureza, a las que a correspondido distinta absorbancia neta (véase los primeros valores de la Tabla VI).

Por lo que aunque se haya estimado la longitud de onda dominante (véase Tabla VI) somos conscientes de que el procedimiento más exacto para definir el color es el de la C.I.E., que entendemos que por primera vez se ha aplicado a la miel.

La precisión del método de la C.I.E. ha sido estudiada efectuando diez medidas diferentes de la misma muestra. Véase Tabla VII.

TABLA VI

Estudio de la escala de Barbier y Valin mediante el método de la C.I.E.
y el método propuesto.

Nº de la escala	mg yodo litro	Absorbancia neta	Long. de onda dominante		COLORES
13	19'5	0'0045	574'7		
15	31'4	0'0091	574'8	1	"BLANCO" (incoloro)
17	50'7	0'0166	574'9	2	
19	81'5	0'0284	575'1	3	
19	81'5	0'0284	575'1		
21	131'6	0'0478	575'5	1	AMARILLO
23	212'0	0'0788	576'1	2	
25	342'0	0'1290	577'1	3	
25	342'0	0'1290	577'1		
27	550'0	0'2093	578'7	1	DORADO
29	890'0	0'3406	581'2	2	
31	1430	0'5491	585'3	3	
31	1430	0'5491	585'3		
34	2310	0'8888	591'9	1	ANBAR
36	3720	1'433	602'5	2	
38	6000	2'313	619'7	3	
38	6000	2'313	619'7		
40	9500	3'665	645'9	1	OSCURO
42	15500	5'981	691'6	2	
44	25400	9'803	765'7	3	

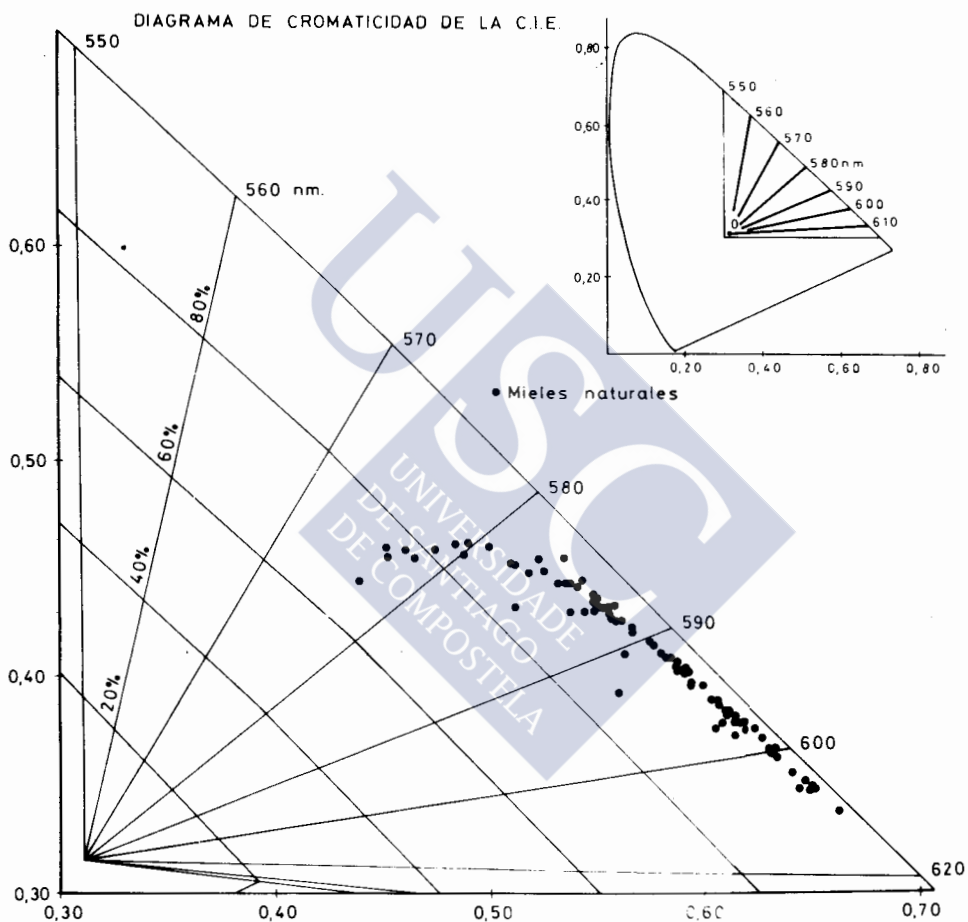


Figura 1

Aspecto global y parcial del diagrama cromático de la C.I.E. de las 91 mieles naturales.

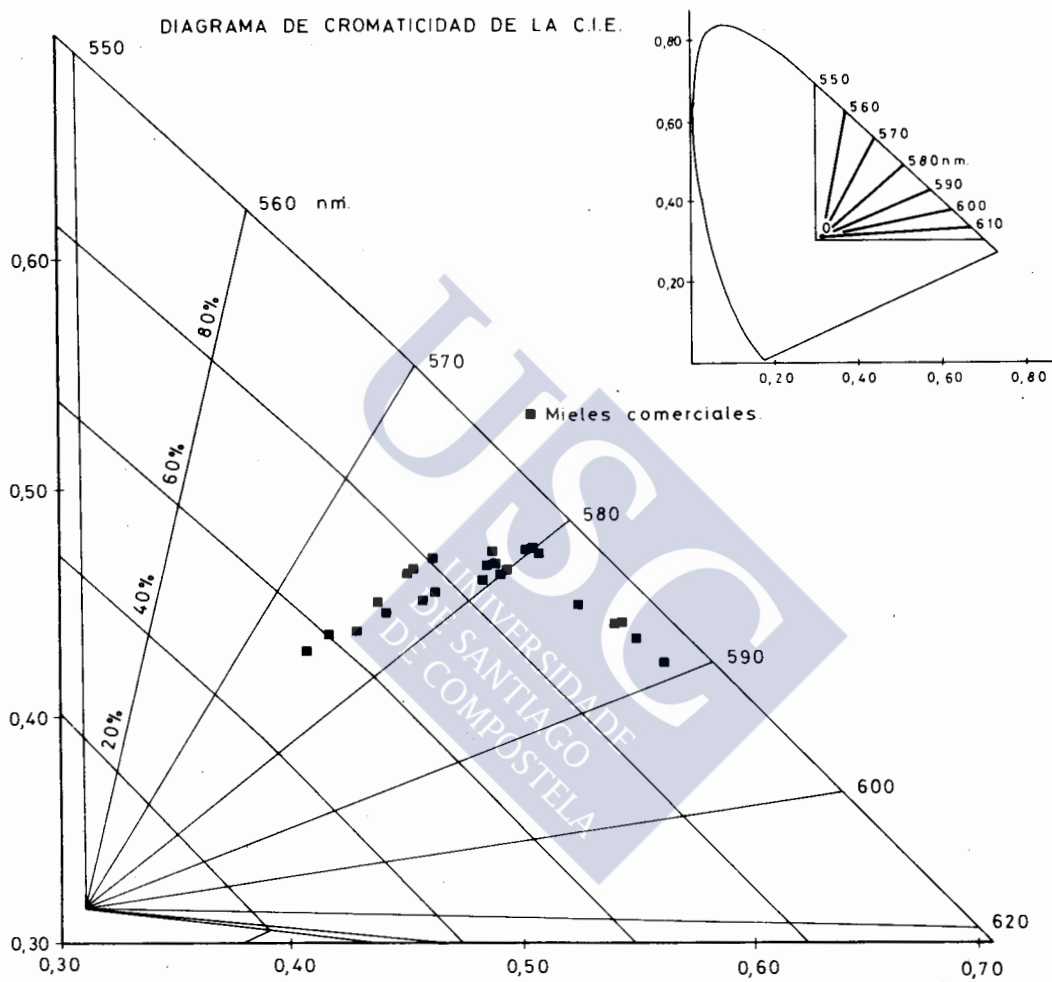


Figura 2

Aspecto global y parcial del diagramas cromático de la C.I.E. de las 24 mieles comerciales.

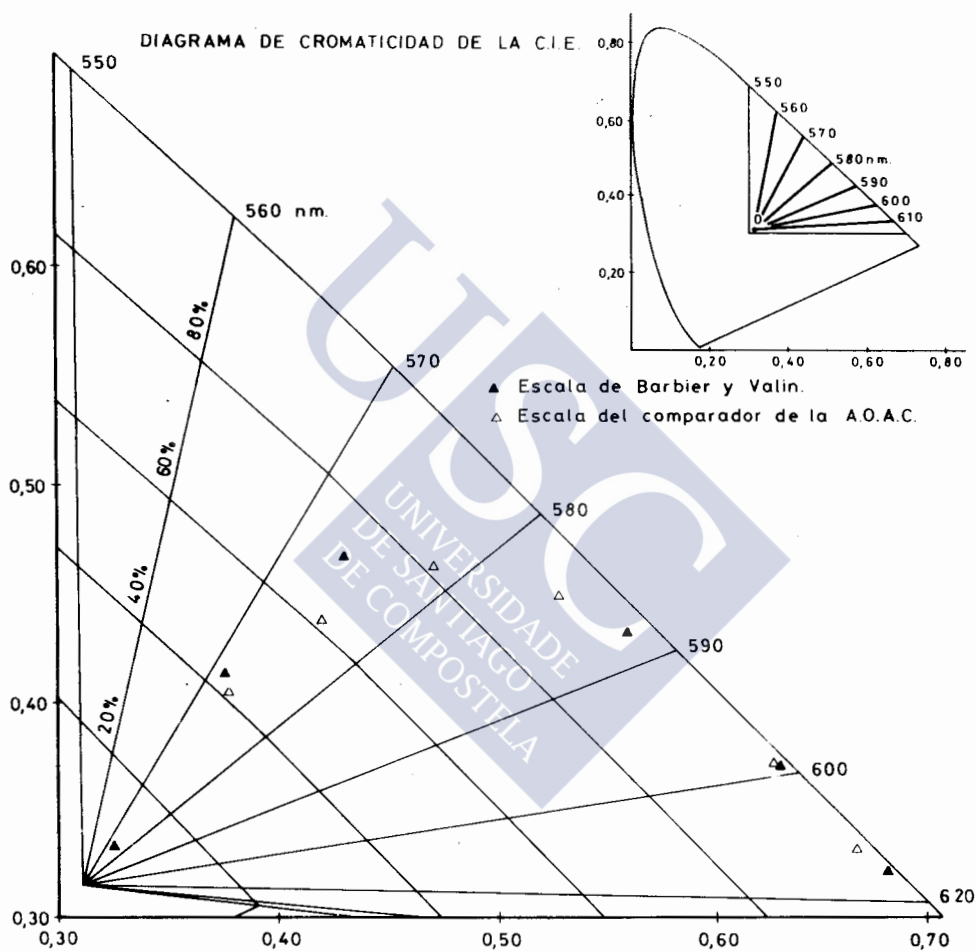


Figura 3

Valores de cromaticidad de las escalas de Barbier y Valin y de la A.O.A.C. en el diagrama de la C.I.E.

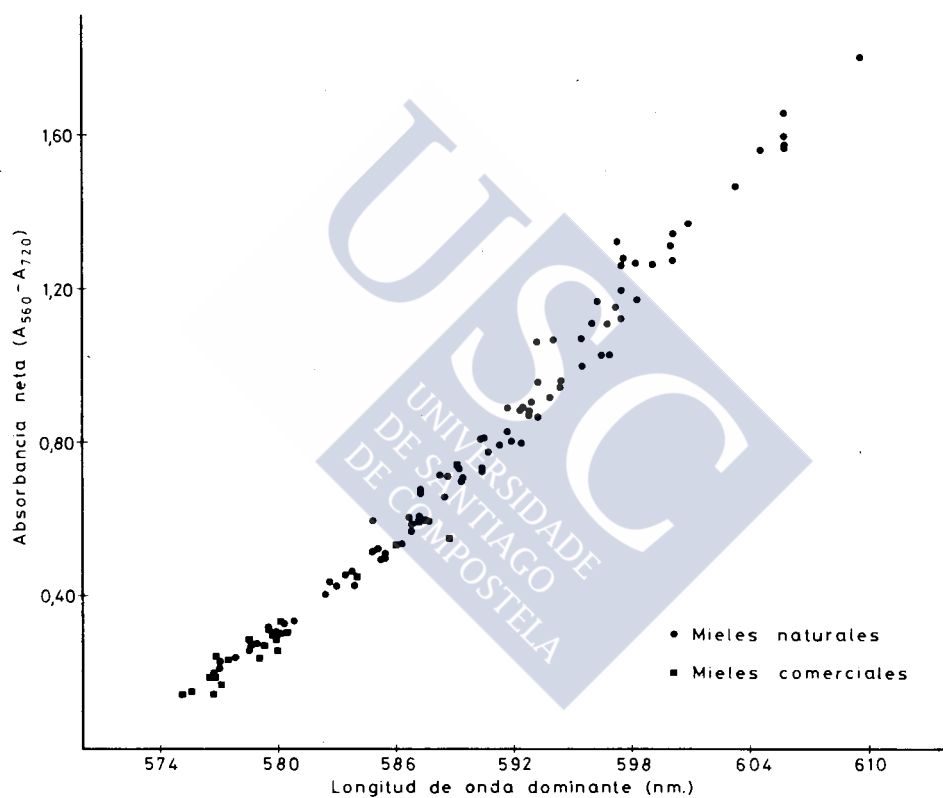


Figura 4

Correlación entre la absorbancia neta ($A_{560} - A_{720}$) y la longitud de onda dominante (nm) de las mieles analizadas.

TABLA VII

Precisión del método de la C.I.E., del método propuesto y de la Turbidez.

x	y	Luminosidad relativa	Long. onda dominante	Pureza	Absorbancia neta	Turbi- dez	
0'438	0'450	45'0	576'6	68'7	0'195	0'212	
0'438	0'450	45'0	576'6	68'7	0'195	0'210	
0'439	0'450	45'0	576'8	68'8	0'196	0'212	
0'439	0'450	45'0	576'8	68'8	0'196	0'210	
0'438	0'450	45'0	576'6	68'7	0'195	0'210	
0'438	0'451	45'1	576'4	68'7	0'195	0'210	
0'438	0'450	45'0	576'6	68'7	0'195	0'210	
0'438	0'450	45'0	576'6	68'7	0'195	0'210	
0'439	0'450	45'0	576'8	68'8	0'196	0'210	
0'439	0'451	45'1	576'4	69'3	0'195	0'210	
\bar{x}	0'438	0'450	45'0	576'6	68'8	0'195	0'210
S_{n-1}	0'000516	0'000421	0'0421	0'1476	0'1853	0'000516	0'000843
$Cv\bar{x}$	0'12	0'094	0'094	0'026	0'26	0'26	0'40

TABLA VIII

Lectura espectrofotométrica de los grados de turbidez (Cloudy) del comparador de la A.O.A.C.

Cloudy nº	Concentración mg. tierra de diatomeas/litro	Absorbancia[*] a 720 nm.
1	100	0'085
2	200	0'135
3	400	0'248
4	800	0'466
5	1.600	0'903
$r = 0'9996$ $y = 0'0005464x + 0'0285$ <p>Absorbancia mg/l</p>		

^{*} **Nota: El espectrofotómetro se ha ajustado en todas las ocasiones a 560 nm.**

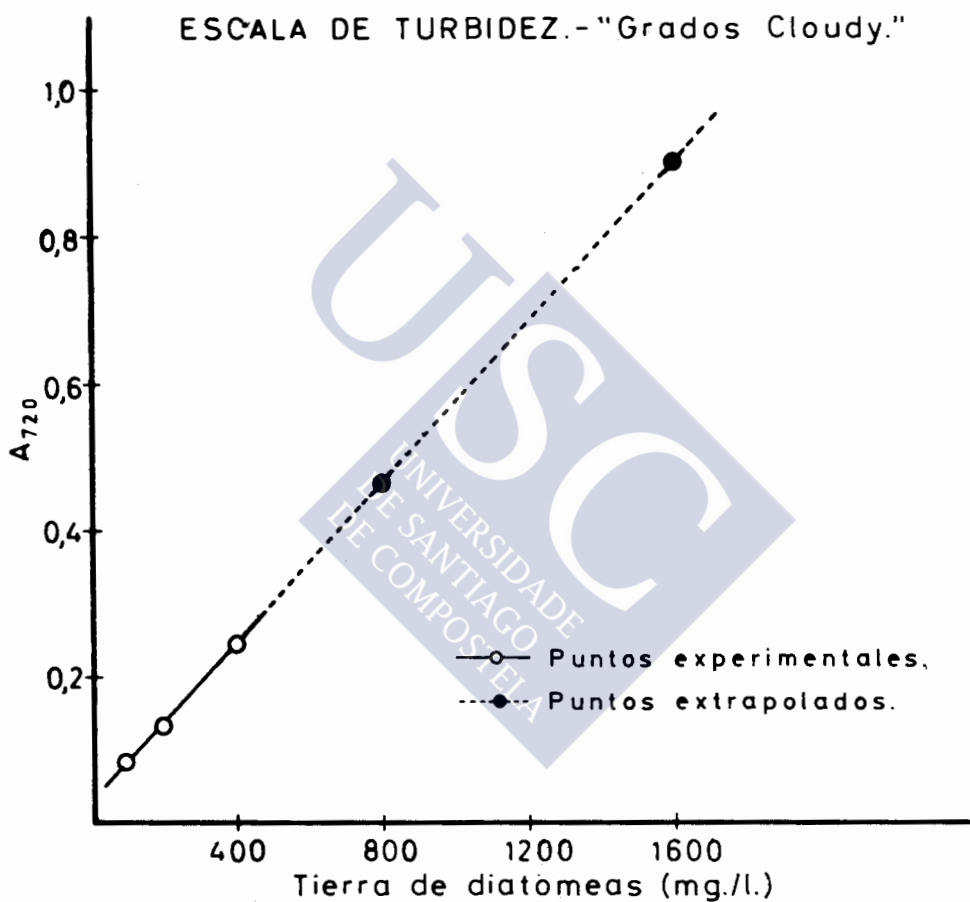


Figura 5

Correlación entre la absorbancia a 720 nm y los grados Cloudy.

Otra conclusión que podremos obtener de la observación de la Tabla VI es la circunstancia de que no se han encontrado muestras oscuras de la clasificación de la escala de Barbier y Valin, lo cual coincide en cierta medida con la escala americana que sitúa el valor más alto (Amber) con la longitud de onda dominante de 613 nm, absorbancia neta 2'00, equiparado al color Ambar 3 de la escala de Barbier y Valin.

Los resultados de la absorbancia neta, longitud de onda dominante, pureza y turbidez tanto para las mieles comerciales, como para las naturales aparecen en las tablas de resultados.

Con la turbidez se ha procedido de modo análogo, una lectura de los 3 grados americanos: Cloudy 1, Cloudy 2 y Cloudy 3 (A.O.A.C. 1980) empleando la cubeta de 1 cm de espesor, habiendo obtenido a 720 nm las lecturas que figuran en la Tabla VIII.

Quedando las muestras analizadas, muchas veces fuera de esta reducida escala, por lo que creemos conveniente usar la extrapolación para los grados superiores. Recogidos también en la Figura 5.

3.2.- DETERMINACION DE LA ACIDEZ (pH, ACIDEZ LIBRE, LACTONICA Y TOTAL) E INDICE DE FORMOL.

3.2.1.- Fundamento

Como es sabido el pH y la acidez libre y total permiten la evaluación global de la acidez actual y potencial de una muestra respectivamente. Más desconocida quizás sea la acidez láctica cuya medida se basa en establecer el consumo de alcalí necesario para la ruptura de este grupo funcional, lo cual implicará una cuidadosa medida de los anteriores parámetros para prevenir la hidrólisis del enlace láctico.

El índice de formol será la acidez generada tras la adición de solución de formaldehído previamente neutralizada.

3.2.2.- Reactivos

- Agua libre de anhídrido carbónico. Obtenida pasando nitrógeno gaseoso a través de agua destilada tanto durante la ebullición como su posterior enfriamiento. Guárdese en botella cerrada.

- Solución de hidróxido de sodio 0,05 N (libre de carbonatos).

- Solución de ácido clorhídrico 0,05 N.

- Solución de formol al 35% previamente neutralizada a pH 8'3.

3.2.3.- Material y aparatos

- Potenciómetro Metrohm Herisau E/353 B.

- Electrodo de vidrio combinado EA-120.

- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.2.4.- Procedimiento

Se disuelven 10'00 g de muestra en 75 ml de agua libre de anhídrido carbónico en un vaso de precipitados de 250 ml con ayuda de agitación magnética, posteriormente se sumerge el electrodo en la solución agitada constantemente y a la temperatura de 20°C, anotando la lectura a continuación.

Se valora con solución de hidróxido de sodio 0'05

N a una velocidad de 5 ml por minuto hasta un pH de 8'50 (acidez libre). Inmediatamente se añaden 10'00 ml de hidróxido sódico 0'05 N y se valora el exceso de ésta con clorhídrico 0'05 N llevando la solución a pH 8'3 (acidez láctónica). Se añaden 15 ml de solución de formol neutralizada y se valora la acidez generada con hidróxido sódico 0'05 N llevando la solución a pH 8'3.

3.2.5.- Cálculos y expresión de resultados

- Acidez libre = factor de la NaOH (ml de NaOH 0'05 N de la bureta - ml de NaOH 0'05 N consumidos por el blanco) $\times \frac{50}{\text{g de muestra}}$
- Acidez láctónica = (factor de NaOH \times 10'00 - factor del ClH \times volumen de ClH) \times 0'05 $\times \frac{50}{\text{g de muestra}}$
- Acidez total = Acidez libre + acidez láctónica (ambas expresadas en meq./Kg).
- Índice de formol = factor de la NaOH \times volumen de la NaOH \times 0'05 $\times \frac{50}{\text{g de muestra}}$ (meq/100 g).

3.2.6.- Precisión

Tras la realización de las determinaciones en la forma anteriormente descrita en número de 10 sobre la misma muestra los resultados obtenidos fueron recogidos en la Tabla IX.

Estos parámetros han sido medidos en las muestras y sus resultados aparecen en las tablas correspondientes. Véase apartado 4.

TABLA IX

Precisión de la determinación de la acidez e índice de formol.

ACIDEZ					
pH	LIBRE	(meq/Kg)	TOTAL	INDICE DE FORMOL	
		LACTONICA		(meq/100 g)	
4'06	25'8	4'6	30'4	0'65	
4'04	25'8	4'5	30'3	0'65	
4'05	26'0	4'6	30'6	0'64	
4'05	26'0	4'6	30'6	0'65	
4'06	26'0	4'6	30'6	0'64	
4'08	26'0	4'5	30'5	0'65	
4'05	25'8	4'5	30'3	0'65	
4'08	25'9	4'5	30'4	0'64	
4'00	25'8	4'5	30'3	0'65	
4'08	25'8	4'5	30'3	0'64	
\bar{x}	4'06	25'89	4'54	30'43	0'646
S_{n-1}	0'024	0'099	0'051	0'134	0'0052
Cv%	0'60	0'38	1'13	0'44	0'80

3.3.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN CENIZAS

3.3.1.- Fundamento

Se determina por calcinación de la muestra una vez pesada en una cápsula previamente incinerada y tarada, desecado su contenido mediante radiaciones infrarrojas, calcinado y pesado el conjunto, una vez enfriado de forma conveniente. La diferencia de peso entre el de la cápsula con cenizas y el de la misma sola, representa las correspondientes a la miel sometida a ensayo.

3.3.2.- Material y aparatos

- Cápsulas de cuarzo (de 55 mm de diámetro aproximadamente).
- Lámpara infrarroja de 375 vatios con regulador de potencia variable.
- Horno Heraeus Hanau W.C. tipo K.R. 170.
- Desecador provisto de silicagel como agente deshidratante.
- Material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.3.3.- Procedimiento

La cápsula que va a contener la miel se calcina y se tara en balanza analítica. Sobre ésta se pesa la miel exactamente (5-10 g).

Se somete la cápsula con la muestra a las radiaciones infrarrojas provenientes de la lámpara situada encima de ésta de tal manera que se evite la formación de espuma y rebosamiento. La distancia fue distinta según la muestra.

TABLA X

Precisión del procedimiento de determinación de cenizas

	0'200
	0'200
	0'200
	0'202
	0'201
	0'203
	0'202
	0'201
	0'202
	0'203
<hr/>	
\bar{x}	0'2014
S_{n-1}	0'00117
$Cv\%$	0'58

Después de carbonizada se calcina a 600°C hasta peso constante (esta operación suele durar toda una noche).

3.3.4.- Cálculos y expresión de resultados

Los resultados se expresan en % de cenizas.

3.3.5.- Precisión

Como en anteriores ocasiones se realizó por la determinación del parámetro objeto de estudio 10 veces sobre la misma muestra comercial de miel. Los resultados obtenidos figuran en la Tabla X.

Los resultados experimentales se recogen en las tablas correspondientes.

3.4.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN AGUA

La evaluación de este parámetro ha sido dado a conocer con ocasión de una publicación presentada a las III Jornadas Farmacéuticas celebradas en La Manga del Mar Menor. Dicho artículo también ha sido solicitado por la revista OFFARM para su reproducción.

El trabajo a que hacemos referencia contiene un estudio sobre la precisión y exactitud de los métodos de desecación a vacío a 60°C y presión menor de 50 mm de Hg, método basado en el índice de refracción (oficial en la A.O.A.C. y entre nosotros) y el método de Karl Fischer que ha sido utilizado por nosotros con aplicación directa de la miel, sin necesidad de su disolución en metanol.

Como se puede observar en el trabajo que comentamos

los tres métodos estudiados tienen una notable precisión, que en el peor de los casos llega al 0'55% de Cv.

Por lo que se refiere a la exactitud, los métodos han sido utilizados en 24 muestras comerciales y tras su estudio estadístico han puesto de manifiesto la coincidencia de resultados para los métodos de desecación a vacío y Karl Fischer ("t" experimental = 0,12), en tanto que el método que emplea el índice de refracción y el de Karl Fischer muestra una "t" experimental de 4'2, lo que permite concluir la discrepancia (inexactitud) del método oficial por su falta de especificidad.

Por nuestra parte, proponemos como método para la determinación de este importante parámetro la aplicación del método de Karl Fischer por medida directa del contenido en agua en las mieles, de porciones alícuotas representativas de la muestra en la vasija de reacción.

Para este trabajo experimental no obstante, hemos probado el "sistema Reaquant" para la determinación de agua (J.T. Baker, 1980) que introduce como agente valorante y disolvente una mejora importante del método yodo/dióxido de azufre (Karl Fischer) con las siguientes ventajas:

- No contiene piridina ni dióxido de azufre, por lo tanto sin olores tóxicos.
- Alta velocidad de reacción, gracias a un buen tampón de alta concentración de metil-sulfito.
- Utilización en amplias gamas de muestras incluidos aldehídos y cetonas.
- Excelente estabilidad y duración, que permite su almacenamiento en lugar fresco y seco.
- Posibilidad de establecer el punto final visualmente, ya que no se forma el compuesto amarillo (SO_2I^-).
- Finalmente, los resultados hallados por este método aseguran valores exactos que muestran una excelente correlación con el de Karl Fischer.

Tras su aplicación para comprobar la precisión y

exactitud, el procedimiento ha sido desechado porque no permite la valoración continua de muestras sobre la misma vasija dado que el aparente tampón es un ingrediente importante de la reacción (metil-sulfito) que a la segunda o tercera adición de muestra se saturaba y debía ser renovado.

Por lo que a pesar de las anunciadas ventajas, no lo hemos considerado oportuno para sustituir al reactivo de Karl Fischer, que permite hacer gran número de muestras de modo continuo y con una detección electrométrica reproducible, exacta, rápida y automática.

3.5.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN AZÚCARES

El análisis de los azúcares en la miel en este trabajo comprende:

La cuantificación global de azúcares reductores (glucosa, fructosa y "maltosa"), modificación del método de Lane Eynon, en la que se realiza la valoración a volumen constante de 25'0 ml.

La glucosa y la fructosa, azúcares mayoritarios de la miel, son determinados de modo específico mediante métodos enzimáticos.

La maltosa aparente ha sido deducida por la diferencia del contenido en azúcar reductor expresado en azúcar invertido y el correspondiente a la cantidad de glucosa y fructosa hallados anteriormente. El resultante saldo de poder reductor se corresponderá con una cantidad determinada de "maltosa".

La sacarosa aparente es determinada por el aumento del poder reductor tras la inversión ácida de la solución por el método de Walker y la posterior conversión de este aumento en sacarosa.

El contenido en dextrinas se establece precipitándolas con alcohol y posterior resta de los azúcares reductores y sacarosa del peso del precipitado convenientemente.

temente desecado.

Los resultados encontrados para estos parámetros y su distribución en las muestras comerciales y naturales se hallan en el apartado de Resultados y Discusión.

3.5.1.- Azúcares reductores

3.5.1.1.- Fundamento

La cuantificación global del poder reductor, expresado en azúcar invertido, se realiza mediante el método de Lane Eynon modificado (B.O.E. 1975).

3.5.1.2.- Reactivos

- Sulfato cúprico pentahidratado Probus
- Tartrato sódico potásico Probus
- Hidróxido sódico Probus
- Sacarosa pura Merck Art. 7651
- Ácido clorhídrico concentrado al 36'5%(p/p) aproximadamente Probus
- Sulfato de potasio y aluminio crist. puriss. Merck Art. 1042
- Azul de metileno Geigy
- Hidróxido amónico d=0'923 Probus
- Papel de tornasol Merck
- Cloruro de bario Probus

3.5.1.3.- Material y aparatos

- Papel de filtro Whatman nº 40 de 11 cm de diámetro.
- Bureta cuya caída dista 20 cm. del eje reservorio.
- Cronómetro "hanhart".
- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.5.1.4.- Procedimiento

La solución de Fehling ha sido normalizada frente al azúcar invertido obtenido a partir de la sacarosa reactivo.

Todas las muestras han sido clarificadas con crema de alúmina y se ha seguido para asegurar que la reducción se realiza a volumen constante, la titulación preliminar según se describe en el método oficial (B.O.E. 1975).

3.5.1.5.- Cálculos y expresión de resultados

Se ha seguido el apartado 6.1.4.1. del B.O.E. 1976.

$$\text{azúcar invertido \%} = \frac{25}{\text{Peso de muestra utilizada}} \times \frac{1000}{\text{ml. de sol. diluida de miel.}}$$

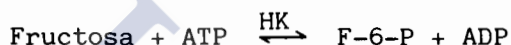
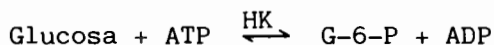
3.5.1.6.- Precisión

La presión de este método ha sido estudiada con ocasión de un trabajo de Licenciatura que hemos codirigido (Simal, J., Huidobro, J.F. y Araquistain, J.L. 1981) en que se establece un Cv% de 0'31.

3.5.2.- Determinación del contenido de glucosa y de fructosa.

3.5.2.1.- Fundamento

La glucosa y la fructosa se fosforilan mediante la enzima hexoquinasa (HK) y adenosin-5'-trifosfato (ATP) a glucosa-6-fosfato (G6P) y fructosa-6-fosfato (F6P) respectivamente como indican las reacciones:



En presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la G6P es oxidada por el nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato (NADP) a gluconato-6-fosfato. Se forma nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato reducido (NADPH).



La cantidad de NADPH formada durante la reacción equivale a la cantidad de glucosa. El NADPH es medible y se determina por su absorbancia a 340 nm.

Una vez transcurrida esta reacción la F6P es transformada por la fosfoglucosa-isomerasa (PGI) a G6P como se indica:



La glucosa-6-fosfato formada proveniente de la F6P vuelve a reaccionar con el NADP formándose gluconato-6-fosfato y NADPH. También aquí es medible el NADPH, cantidad ésta, que se equivale a la fructosa (Boehringer Mannheim, 1976).

3.5.2.2.- Reactivos

Se ha empleado el "test UV" para la determinación de glucosa y fructosa en alimentos N° 15624 para 25 determinaciones de cada una de la casa Boehringer Mannheim, S.A. conteniendo 3 frascos:

- El primer frasco con aproximadamente 4'6 g de liofilizado compuesto por: Tampón de trietanolamina pH 7'6, 64 mg de NADP, 160 mg de ATP, sulfato magnésico y estabilizadores. El contenido del frasco se disuelve con 27 ml de agua bidestilada reciente y la solución es estable por lo menos durante 4 semanas a + 4°C.

- El segundo frasco con 0'7 ml de suspensión de enzimas contiene aproximadamente 200 U, de hexoquinasa y 100 U. de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

- El tercer frasco con 0'7 ml con 490 U. de fosfoglucosa isomerasa. Tanto ésta como la anterior se emplean sin diluir y son estables por lo menos durante un año a + 4°C.

Además del test compuesto por estos 3 frascos se ha utilizado:

- Agua bidestilada reciente.
- Sulfato de potasio y aluminio crist. puriss. Merck. Art. 1042.
- Timol puro crist. Chemicalia.
- D (+) Glucosa anhidra Merck Art. 8337.
- D (-) Fructosa Merck Art. 5323.

3.5.2.3.- Material y aparatos

- Espectrofotómetro Hitachi modelo 100-60, ultravioleta visible, de doble haz.
- Cubetas de cuarzo apareadas de 1 cm de espesor.

- Pipeta automática Eppendorf 3130 de 20 μ l.
- Parafilm.
- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.5.2.4.- Procedimiento

- Preparación de la muestra

En la determinación del contenido en azúcar reductor de la miel se tomaban alrededor de 25 g, exactamente pesados, se llevaban a un matraz de 100 ml, se añadían 5 ml de crema de alúmina, se filtraban, se tomaban 10 ml del filtrado y se llevaban a 500 ml con agua destilada. Pues bien a partir de ésta se diluye de tal forma que para la prueba, 2 ml de la misma contengan aproximadamente unos 40 μ g de cada azúcar (una cantidad equivalente al 0'1 ml que sugiere Boehringer).

Si la solución no es objeto de ensayo inmediato, añadir unos cristales de timol y guardarla en nevera a una temperatura de + 4°C convenientemente cerrada.

- Determinación del valor de los blancos

Pipetear 1,0 ml de la solución 1 y 2 ml de agua destilada en una cubeta, mezclar (se recomienda tapar con parafilm la cubeta) y al cabo de unos 3 minutos leer el valor de la absorbancia frente a la otra cubeta apareada que contiene agua destilada. Sea el valor de ésta A_1 .

Se pipetea 0'02 ml de la suspensión 2 en la cubeta que sirve de prueba, se agita y se espera al paro de la reacción lo que ocurre en 10 ó 15 minutos. Se lee contra la misma cubeta conteniendo agua destilada. Valor de la absorbancia A_2 .

Al igual que en el anterior, se pipetea 0'02 ml

pero esta vez de suspensión 3 en la cubeta que sirve de prueba, se agita, se esperan entre 10 y 15 minutos y se lee frente a la misma cubeta que en las dos ocasiones anteriores. El valor obtenido sea A_3 .

El valor de los blancos será $A_2 - A_1$ y $A_3 - A_2$.

- Determinación de las absorbancias con la muestra

Se realiza análogamente (leyendo siempre frente a agua destilada), y en el mismo orden y tiempos pero esta vez en lugar de los 2 ml de agua destilada, serán los 2 ml de solución de miel (equivalente como ya se ha indicado al 0'1 ml de la solución al 1% (P/V) que prepara el autor).

Obteniéndose los valores M_1 , M_2 y M_3 respectivamente.

3.5.2.5.- Cálculos y expresión de resultados

Los valores debidos a los incrementos será: $M_2 - M_1$ y $M_3 - M_2$. A éstos habrá que restar el de los respectivos blancos: $A_2 - A_1$ y $A_3 - A_2$. El incremento de absorbancia debido a la glucosa será $(M_2 - M_1) - (A_2 - A_1)$ y el de la fructosa vendrá dado por $(M_3 - M_2) - (A_3 - A_2)$.

Según la fórmula general de cálculo para la determinación de la concentración resulta:

$$C = \frac{V \cdot P_m}{\epsilon \cdot b \cdot v \cdot 1000} \quad (\text{mg/ml}) \text{ siendo:}$$

V : volumen total de la prueba (ml).

v : volumen de la muestra (ml).

Pm : peso molecular de la sustancia a determinar.

b : espesor de la cubeta en cm.

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm = 6'22 ($\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$).

De ésta resulta para la glucosa:

$$\frac{3'02 \times 180'16}{6'22 \times 1 \times 0'1 \times 1000} \quad \Delta A \text{ (glucosa)}$$

$$\text{y glucosa \%} = \frac{5'441 \times \Delta A \text{ glucosa} \times \text{Peso en gramos de muestra}}{6'22 \quad 25}$$

Análogamente para la fructosa:

$$\frac{3'04 \times 180'16}{6'22 \times 1 \times 0'1 \times 1000} \quad \Delta A \text{ (fructosa)}$$

que referido a nuestro caso resulta:

$$\text{fructosa \%} = \frac{5'447 \times \Delta A \text{ fructosa} \times \text{Peso en gramos de muestra}}{6'22 \quad 25}$$

En nuestras condiciones de trabajo nunca se requirió la extrapolación para la medida de las absorbancias. Ahora bien, cuando la determinación se realiza clarificando la miel con crema de alúmina, la parte recta se alcanza más rápidamente como puede verse en la Figura 6 y esta operación no afectó tanto a la exactitud como a la precisión.

3.5.2.6.- Precisión

El estudio de la precisión del método se realizó tomando como muestra una miel comercial y siguiendo el método anteriormente descrito. Los resultados se reflejan en la Tabla XI.

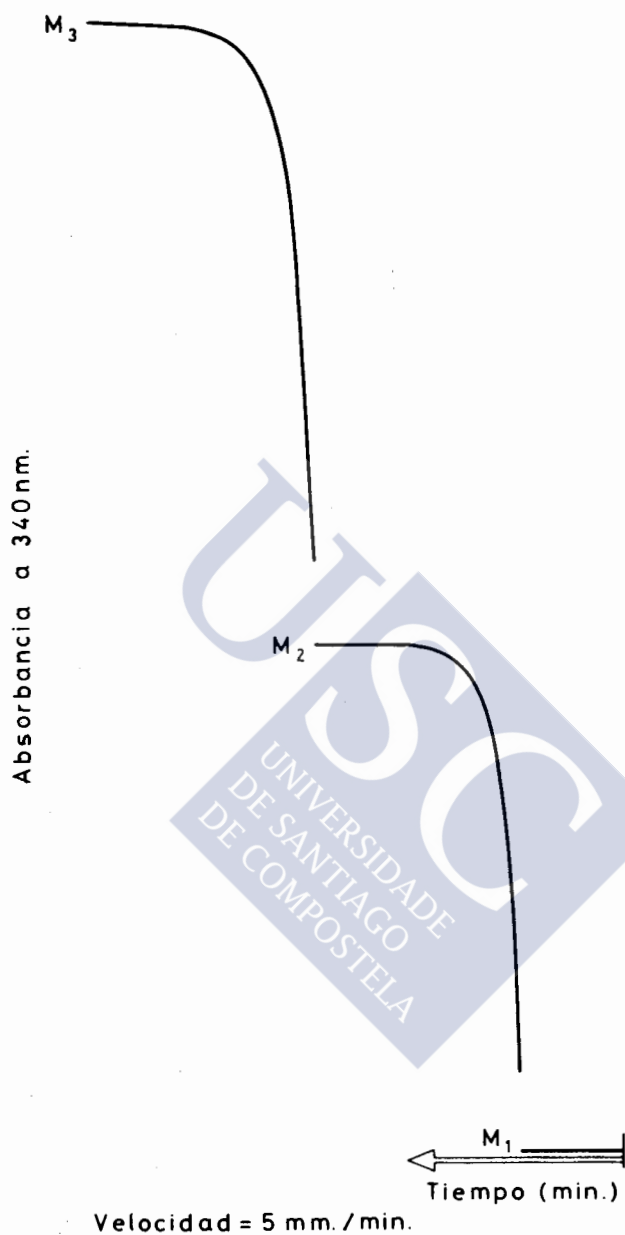


Figura 6

Registros de las absorbancias a 340 nm en la determinación de glucosa y fructosa por el método enzimático.

TABLA XI

Precisión del método enzimático para la determinación de glucosa y fructosa.

<u>GLUCOSA</u>	<u>FRUCTOSA</u>
32'6	39'6
32'6	39'6
32'7	39'6
32'7	39'4
32'7	39'5
32'6	39'6
32'7	39'5
32'7	39'5
32'7	39'6
32'7	39'5
<hr/>	<hr/>
\bar{x} 32'7	\bar{x} 39'5
S_{n-1} 0'048	S_{n-1} 0'070
$Cv\%$ 0'15	$Cv\%$ 0'18

TABLA XII

Estudio de la recuperación del método enzimático

GLUCOSA PRESENTE	GLUCOSA		RECUPERACION
	AÑADIDA	ENCONTRADA	
13'76	10	23'88	101'2
	10	23'88	101'2
	10	23'79	100'3
	15	28'87	100'7
	15	28'95	101'3
	15	29'04	101'9
	20	33'94	100'9
	20	33'94	100'9
	20	34'02	101'3
	20	33'94	100'9
			\bar{x} 101'1
			S_{n-1} 0'427
17'09	FRUCTOSA		RECUPERACION
	AÑADIDA	ENCONTRADA	
	10	27'21	101'2
	10	27'12	100'3
	10	26'94	98'5
	15	31'96	99'1
	15	31'96	99'1
	15	32'14	100'3
	20	36'98	99'5
	20	36'98	99'5
	20	37'15	100'3
	20	37'15	100'3
			\bar{x} 99'8
			S_{n-1} 0'803
			$Cv\%$ 0'81

3.5.2.7.- Exactitud

La evaluación de la exactitud del método se llevó a cabo añadiendo cantidades crecientes conocidas de glucosa y fructosa a una solución de miel y llevando ésta a un volumen apropiado. La solución de miel y las cantidades adicionadas fueron de tal magnitud que la absorbancia más alta no superase el valor de la unidad. Obteniéndose los resultados que muestra la Tabla XII.

Los valores de glucosa y fructosa respectivamente: 13'76 y 17'09, descontados de las cantidades encontradas y referidos a 100 permiten conocer la recuperación.

3.5.3.- Determinación del contenido aparente en maltosa

Habida cuenta que los azúcares reductores en la miel básicamente son: glucosa, fructosa y maltosa, establecidos los dos primeros de forma específica mediante el método enzimático antes descrito y de otro lado el poder reductor global parece lógico que podamos sugerir como método para la determinación de la maltosa con suficientes garantías el que a continuación se detalla.

3.5.3.1.- Fundamento

La maltosa aparente es calculada por la diferencia del contenido en azúcar reductor expresado en azúcar invertido y el equivalente en éste de la glucosa y fructosa previamente determinados.

3.5.3.2.- Reactivos

Los mismos que en los apartados 3.5.1.2. y 3.5.2.2.

3.5.3.3.- Material y aparatos

Análogos a los apartados 3.5.1.3. y 3.5.2.3.

3.5.3.4.- Cálculos y expresión de resultados

Al haberse realizado la determinación del contenido en azúcar reductor a volumen constante de 25,0 ml, se encuentra la siguiente correspondencia en las tablas de Lane Eynon.

51,2 mg azúcar reductor - 49,8 mg de glucosa - 52,8 mg de fructosa.

Por lo tanto:

49,8 mg de glucosa	51,2 mg de azúcar invertido
% de glucosa	% de azúcar invertido equivalente a la glucosa.

52,8 mg de fructosa	51,2 mg de azúcar invertido
% de fructosa	% de azúcar invertido equivalente a la fructosa.

El total de azúcar reductor, expresado en azúcar invertido, menos la suma de los tantos por ciento de azúcar invertido correspondiente a la glucosa y fructosa da el poder reductor expresado en azúcar invertido equivalente a la maltosa aparente.

Por lo que:

Si 51,2 mg de azúcar invertido se corresponden con 76,4 mg de maltosa anhidra, aquel valor permitirá conocer el porcentaje de maltosa.

3.5.3.5.- Precisión y exactitud

El cálculo de la maltosa aparente se realiza en base a los contenidos en azúcar reductor por una parte, y a la determinación de glucosa y fructosa; todos ellos satisfactorios. Por lo tanto cabe decir que la determinación de la maltosa aparente tendrá los mismos atributos.

3.5.4.- Determinación del contenido aparente en sacarosa

3.5.4.1.- Fundamento

Se basa en el método de inversión de Walker (B.O.E. 1975).

3.5.4.2.- Reactivos

Los mismos que para azúcares reductores (apartado 3.5.1.2.) o (6.2.2. de la Norma sobre la miel B.O.E. 1975).

Se emplea para la inversión ácido clorhídrico 6,34 N y se realiza la neutralización del exceso de ácido con una solución de hidróxido sódico 5 N.

3.5.4.3.- Material y aparatos

Los mismos que los del apartado 3.5.1.3. y además:

- Baño ultratermostático Haake tipo NBS.
- Termómetro de décimas hasta 100°C.

3.5.4.4.- Procedimiento

Sensiblemente coincide con el señalado en los métodos oficiales de la Norma sobre la miel, apartados 6.2.4.2. (B.O.E. 1975).

La preparación de la muestra se ha realizado como para las anteriores determinaciones, con clarificación previa con crema de alúmina; la única diferencia introducida ha sido utilizar un ultratermostato en lugar de un baño María que el método señala.

3.5.4.5.- Cálculos y expresión de resultados

El cálculo de la sacarosa aparente se realiza multiplicando por 0,95 el incremento del poder reductor tras la inversión.

3.5.4.6.- Precisión

Ha sido establecida en un trabajo de licenciatura en este Departamento, siendo el método satisfactorio en este aspecto $C_v\% = 0'60$ (Simal, J., Huidobro, J.F y Araquistain, J.L. 1981).

3.5.5.- Determinación del contenido en dextrinas

3.5.5.1.- Fundamento

Se basa en la propiedad que poseen las dextrinas de precipitar en medio alcohólico y ser solubles en agua hirviendo. Este líquido se evapora a sequedad obteniéndose un residuo en que además de entrar a formar parte las dextrinas, existen azúcares reductores y sacarosa. Este residuo se disuelve en agua hirviendo en la proporción conveniente y posteriormente se determinan azúcares re-

ductores y sacarosa de análoga forma a los métodos de sus correspondientes apartados. Del peso del residuo, se restan éstos dos últimos valores, obteniéndose el valor de las dextrinas correspondientes al peso de muestra de miel tomado para el análisis.

Básicamente coincide con el procedimiento que incluye la A.O.A.C. (1980).

3.5.5.2.- Reactivos

Además de los necesarios para la valoración de azúcares reductores y sacarosa. Véase apartados 3.5.1.2. y 3.5.2.2. se requiere:

- Arena calcinada y seca de diámetro comprendido entre 0'180 y 0'290 mm.
- Alcohol absoluto Probus 99-100.
- Agua destilada hirviendo.

3.5.5.3.- Material y aparatos

Además del material necesario en los apartados 3.5.1.3. y 3.5.2.3.

- Embudos de pesada.
- Papel de filtro Whatman nº 40 de 11 cm de diámetro
- Pesafiltros con tapa de 55 mm de diámetro y 40 mm de altura, provisto con 25-30 g de arena calcinada.
- Baño María Selecta múltiple para 6 determinaciones simultáneas.
- Estufa a vacío Heraeus.
- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.5.5.4.- Procedimiento

a) Precipitación de las dextrinas

Para ello se toman alrededor de 8 g cuando se trate de mieles claras, o 4 en el caso de mieles oscuras en un embudo de pesada. Se lleva a un matraz de 100 ml escurriendo ésta por gravedad y evitando que lo haga por el cuello. La miel restante que ha quedado en el embudo se disuelve con un máximo de 4 ml de agua, empleados en 3 veces, una de 2 ml y dos de 1. La miel contenida ya en el fondo del matraz se disuelve homogéneamente para lo cual puede ayudarse con un agitador magnético que posteriormente será lavado con el último ml de agua.

Se añade alcohol absoluto, al mismo tiempo que se agita constantemente y se lleva hasta el enrase con alcohol. Se deja tiempo para que precipiten las dextrinas, en nuestro caso toda la noche.

b) Disolución de las mismas

Se decanta el líquido claro a través del filtro y se lava el residuo con alcohol absoluto, pasándolos a través del mismo filtro. Estos líquidos se desechan.

Una vez disueltas las dextrinas por adición de agua hirviendo en pequeñas porciones, se filtra por el filtro ya usado. El líquido total de esta operación se habrá recogido en el pesafiltro tarado con tapa provisto de arena en su interior en la cuantía y tamaño que se especifica en el apartado de material y aparatos; al igual que el del posterior lavado del filtro también con pequeñas porciones de agua hirviendo.

c) Obtención del residuo

El pesafiltro anterior se lleva primero a un baño María hasta evaporación, posteriormente se deseca en estufa de vacío a 60°C y a presión menor de 50 mm de Hg

hasta peso constante.

- d) Determinación de azúcar reductor y sacarosa aparente en el residuo.

Se disuelve el contenido del pesafiltro a razón de 50 ml por cada 0'5 g. En esta solución se determinan los azúcares reductores, posteriormente se hidroliza y se vuelve a determinar azúcares para valorar así la sacarosa aparente. Todo ello como en los correspondientes apartados.

3.5.5.5.- Cálculos y expresión de resultados

Sea: p el peso en g del residuo.

A el contenido en azúcar reductor antes de la inversión referido al total del líquido expresado en g.

B conteniendo en azúcar reductor después de la inversión e igualmente referido al total del líquido, expresado en g.

C el peso en g de la muestra de miel objeto de la determinación.

$$\begin{array}{lcl} p-A-(B-A) \times 0'95 = \text{g de dextrina} & \text{-----} & \text{C g de miel} \\ & \% \text{ -----} & 100 \text{ g} \end{array}$$

3.5.5.6.- Precisión

La precisión del método fué establecida analizando 10 veces una misma muestra de miel comercial, los resultados obtenidos aparecen en la Tabla XIII.

TABLA XIII

Precisión del método de determinación del contenido en dextrinas.

	1'62
	1'63
	1'60
	1'62
	1'60
	1'60
	1'62
	1'60
	1'62
	1'63
<hr/>	
\bar{x}	1'61
S_{n-1}	0'0126
$Cv\%$	0'78

3.6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DIASTASICA

3.6.1.- Fundamento

El procedimiento utilizado, coincidente en parte con el de la Norma sobre la miel (B.O.E. 1975 y 1976) y el de la A.O.A.C. (1980), se basa en observar la evolución de una solución de almidón normalizada por la acción de la amilasa de la miel empleando para hacer visible la hidrólisis una solución yodo-yodurada.

3.6.2.- Reactivos

Son los que figuran en la citada Norma sobre la miel habiendo empleado los productos químicos siguientes:

- Yodo metálico Probus.
- Yoduro potásico Probus.
- Acetato sódico trihidratado Probus.
- Acido acético glacial Probus.
- Cloruro sódico Probus.
- Almidón Panreac para la preparación de la solución de almidón.

Para ello se ha seguido el procedimiento relatado en el apartado 6.7.2.5 de la Norma sobre la miel (B.O.E. 1976) que implica la determinación de su humedad y finalmente la preparación de una solución de almidón normalizada de forma que el índice de azul (lectura de la absorbancia a 660 nm) esté comprendido, en las condiciones del método, entre 0'50 y 0'55.

3.6.3.- Material y aparatos

- Baño ultratermostático Haake, tipo NBS.
- Espectrofotómetro Hitachi 100-60, ultravioleta-visible de doble haz.
- Cubetas apareadas de 1 cm. de espesor.
- Cronómetro "hanhart".
- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.6.4.- Procedimiento

Siguiendo el que se incluye en la Norma sobre la miel hasta obtener una absorbancia menor de 0'235.

3.6.5.- Cálculos y expresión de resultados

Para determinar el valor es necesario representar gráficamente la absorbancia en función del tiempo (minutos) trazando una línea recta que una por lo menos los tres últimos puntos del gráfico para determinar el momento en que la mezcla de reacción alcanza una absorbancia de 0'235 (punto final prescrito cuya transmitancia es el 50%).

En nuestro caso hemos utilizado todos los puntos experimentales y calculado el punto intersección mediante la ecuación de la recta de los mínimos cuadrados.

Es más, con el solo valor de la absorbancia a los 5 minutos y el inicial puede predecirse el índice de diastasa mediante la ecuación de la recta correspondiente. En este sentido en la última edición de la A.O.A.C. (1980) se incluye una relación entre la absorbancia a los 5 minutos y el posible punto final.

Este criterio, sin embargo tiene el inconveniente de que en mieles con baja actividad diastásica la gráfica muestra una curva en los primeros minutos, por lo que es aconsejable en estos casos no incluir aquellos primeros valores, como parece lógico.

El valor en minutos se establece objetivamente, como se ha indicado mediante la ecuación de la recta. El número de la escala de Gothe se obtiene dividiendo 300 por el tiempo.

Dicha relación proviene de que el índice de diastasa son los mililitros de solución de almidón al 1%/gramos de miel/hora a 40°C. La expresión se podrá poner de la forma siguiente:

$$\text{índice de diastasa} = \frac{60 \times 0'1 \times 1'0}{t \times 0'01 \times 2'0} = \frac{300}{t}$$

Donde:

60 es el factor para convertir en minutos las horas.

0'1 es la cantidad de almidón en gramos utilizada en el ensayo.

0'01 son los gramos de almidón necesarios que debe degradar en 1 hora la cantidad de enzima que corresponde a la actividad unidad de la amilasa (Manuel Suisse des Denrées Alimentaires 1974).

3.6.6.- Precisión

Como en casos anteriores, la precisión se estableció tras la determinación de dicho parámetro 10 veces sobre la misma muestra de miel. Los tiempos en alcanzar el valor de 0'235 de absorbancia fueron los siguientes: 11'4; 11'5; 11'5; 11'5; 11'5; 11'4; 11'5; 11'5; 11'5 y 11'5 que corresponden a los valores de la escala de Gothe recogidos en la Tabla XIV.

Los resultados experimentales se encuentran en el Apartado 4.

	26'3
	26'1
	26'1
	26'1
	26'1
	26'3
	26'1
	26'1
	26'1
	26'1
	26'1
\bar{x}	26'1
S_{n-1}	0'084
Cv%	0'32

	26'3
	26'1
	26'1
	26'1
	26'1
	26'3
	26'1
	26'1
	26'1
	26'1
\bar{x}	26'1
S_{n-1}	0'084
Cv%	0'32

3.7.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HIDROXIMETILFURFURAL

Para la evaluación de este parámetro se han ensayado los métodos siguientes:

El de Winkler (1955) basado en la determinación fotométrica del color a 550 nm que tiene lugar cuando en la mezcla de reacción se encuentra el H.M.F. presente en la miel, p-toluidina disuelta en isopropanol y ácido barbitúrico disuelto en agua frente a un blanco conteniendo las dos primeras soluciones y agua en vez de la solución de ácido barbitúrico; oficial entre nosotros (B.O.E. 1975).

Y el que realiza la lectura espectrofotométrica en la región ultravioleta. La miel es disuelta en agua, clarificada y llevada a un volumen. Una parte adicionada de agua sirve como muestra y otra a la que se ha añadido igual volumen de bisulfito sódico es el blanco. El método fue puesto a punto por White (1979b) y adoptado por la A.O.A.C.

En todos los casos la comprobación de los métodos se llevó a cabo utilizando una solución patrón de H.M.F. preparada a partir de 5 Hydroxymethyl-2-furaldehyde Fluka AG, Buchs SG Art. 55690, y ensayado espectrofotométricamente donde $\epsilon = 16830$ (J.H. Turnes, 1954) a 284 nm ($A_{284} - \frac{A_{245} + A_{325}}{2}$) empleando concentraciones de 0 a 300 ug, un ejemplo de este cálculo puede verse en el apartado 3.7.2.7. Es de resaltar que el compuesto debe guardarse en nevera y es fotosensible por lo que el producto y disoluciones serán protegidas adecuadamente. El reactivo viene comercialmente en frasco topacio en atmósfera de nitrógeno en cantidad de 1 g. Hemos observado que es necesaria la comprobación continua de su riqueza, por lo que se recomienda ésta y no el almacenamiento prolongado.

Las soluciones de miel por lo anteriormente expuesto deberán ensayarse inmediatamente y en ambiente de penumbra. La toma de muestra deberá realizarse agitando la misma con ayuda de una espátula para homogenizar la

miel, nunca la miel deberá calentarse como en la medida del índice de diastasa.

3.7.1.- Método oficial en España

3.7.1.1.- Fundamento

Se basa en el método de Winkler (1955), no Winger como indica nuestra legislación por error evidentemente.

3.7.1.2.- Reactivos

- Acido barbitúrico Merck p.a. Art. 132
- p-toluidina para la determinación de H.M.F. según Winkler Merck Art. 10841.
- Isopropanol Merck p.a. Art. 9636.
- Acido acético glacial Merck p.a. Art. 90062.
- Agua destilada (libre de oxígeno) haciendo pasar nitrógeno N-48 a través de agua destilada en ebullición.
- Hidroximetilfurfural ya indicado en la introducción de este parámetro.

3.7.1.3.- Material y aparatos

- Espectrofotómetro Hitachi 100-60, ultravioleta visible de doble haz.
- Cubetas apareadas de 1 cm de espesor.
- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.7.1.4.- Procedimiento

Está indicado en la Norma española sobre la miel (B.O.E. 1975) en su apartado 6.8.5.

3.7.1.5.- Cálculos y expresión de resultados

Como se ha indicado en el método oficial español se consigue establecer los mg de H.M.F./100 g de muestra, mediante la fórmula general de la espectrofotometría multiplicando la absorbancia por la constante 19'2 obtenida con el coeficiente de extinción molar, el espesor de la cubeta, el peso molecular del H.M.F. y el factor de dilución.

3.7.1.6.- Precisión

Como en las anteriores ocasiones se realizó sobre la misma muestra 10 veces. Los resultados de las absorbancias fueron los de la Tabla XV.

En un principio se dudó de los reactivos, más adelante nos preguntábamos si la realización del método por nuestra parte era correcta; pero nada conseguimos para mejorar este aspecto. Aún así, indagamos su exactitud.

3.7.1.7.- Exactitud

Se realizó por la sobrecarga de 7 mieles comerciales con cantidades crecientes de hidroximetilfurfural (previamente determinada su pureza) equivalentes a 18'4, 27'6 y 36'8 mg/Kg. Véase Tabla XVI, al igual que la aplicación del método de Winkler a la misma escala patrón de H.M.F. en agua en dos ocasiones sucesivas.

TABLA XV

Precisión del método de Winkler en la determinación de H.M.F.

	0'105
	0'085
	0'080
	0'090
	0'093
	0'100
	0'087
	0'082
	0'084
	0'090
<hr/>	
\bar{x}	0'0896
S_{n-1}	0'00793
Cv%	8'9

TABLA XVI

Estudio de la recuperación del método de Winkler de la determinación de H.M.F.

H.M.F. PRESENTE EN CADA MIEL	AÑADIDO	ENCONTRADO	RECUPERACION
56'59	9'20	64'22	82'95
	18'40	71'56	81'34
	27'60	78'29	78'62
22'01	9'20	26'80	52'03
	18'40	30'54	46'35
	27'60	35'03	47'17
36'68	9'20	43'41	73'18
	18'40	50'90	77'27
	27'60	59'58	82'97
48'65	9'20	53'74	55'35
	18'40	59'28	57'78
	27'60	64'82	58'59
83'68	9'20	90'87	78'13
	18'40	98'50	80'56
	27'60	105'54	79'20
21'56	9'20	29'49	86'20
	18'40	36'98	83'80
	27'60	43'86	80'80
20'36	9'20	26'20	63'47
	18'40	32'93	68'31
	27'60	39'82	70'51
			\bar{x} 70'69
			S_{n-1} 112'97
			$Cv\%$ 18'35
Patrón 1	18'40	18'41	100'07
	27'60	27'10	98'17
	36'80	35'78	97'22
	46'00	44'31	96'33
Patrón 2	18'40	19'76	107'39
	27'60	27'24	98'71
	36'80	35'18	95'86
	46'00	43'26	94'05
			\bar{x} 98'48
			S_{n-1} 4'05
			$Cv\%$ 4'11

Es de destacar la alta variación, el distinto valor que presenta ésta en el patrón y en las muestras, y entre el mismo patrón. La inexactitud es manifiesta, ésta misma prueba se repitió obteniéndose también resultados discordantes.

Por todo lo cual consideramos que este método debe ser desechado como oficial. No tiene precisión, no tiene exactitud, el reactivo p-toluidina es tóxico, son reactivos caros, etc.

Paralelamente fue puesto a punto el método que emplea bisulfito sódico y que era interinamente oficial en la A.O.A.C. y hoy "Official First Action". El comprobar que éste era correcto y no el de la p-toluidina con el mismo método de trabajo nos convenció más aún de la no idoneidad del método de Winkler, oficial en España y que no había sido considerado por la A.O.A.C.

3.7.2.- Método oficial en la A.O.A.C.

3.7.2.1.- Fundamento

Se basa en utilizar dos porciones alícuotas clarificadas de la muestra. Una de ellas, a la que se adiciona agua destilada se lee frente a la otra, a la cual se le añadió igual volumen pero de solución de bisulfito sódico (que destruye la absorción debida al H.M.F. por rotura de los dobles enlaces conjugados con lo que las otras absorbancias inespecíficas son corregidas).

3.7.2.2.- Reactivos

- Solución Carrez I.- Se disuelven 15 g de ferrocianuro potásico trihidratado Merck p.a. Art. 4984, en agua destilada y se lleva a un volumen de 100 ml.

- Solución Carrez II.- Se disuelven 30 g de acetato

de zinc dihidratado Merck p.a. Art. 8802 en agua destilada y se lleva a un volumen de 100 ml.

- Solución de bisulfito sódico al 0'20 (P/V).- Se pesaron 0'20 g de bisulfito sódico Fluka Art. P 6049 y se llevaron a 100 ml con agua destilada. La disolución se prepara con bisulfito sódico de grado técnico o similar y diariamente.

- Alcohol absoluto Probus 99-100.

3.7.2.3.- Material y aparatos

- Papel de filtro Whatman nº 40 de 11 cm de diámetro.

- Espectrofotómetro Hitachi 100-60, ultravioleta visible de doble haz.

- Cubetas de cuarzo apareadas de 1 cm de espesor.

- Otro material de uso corriente en laboratorios de investigación.

3.7.2.4.- Procedimiento

Se transfieren alrededor de 5 g de miel (pesados en balanza analítica) a un matraz aforado de 50 ml empleando un total de 25 ml de agua destilada. Se añaden 0'50 ml de solución Carrez I, se agita, se añaden 0'50 ml de solución Carrez II, se agita y se lleva hasta el volumen con agua destilada. En caso de formación de espuma en la superficie, añádase un poco de alcohol. Fíltrese sobre papel Whatman nº 40 y rechacense los primeros ml del filtrado.

Se pipetea 5 ml del líquido filtrado en 2 tubos de ensayo de 18 x 150 mm. Se añaden 5 ml de agua al de la muestra y 5 ml de solución de bisulfito al 0'20% (P/V) al testigo. Se mezclan bien y se determina la absorbancia de la muestra frente al blanco en cubetas de 1 cm a las longitudes de onda de 284 y 336 nm. En el caso de que

la absorbancia superase el valor de 0'6, diluir la solución de la muestra con el volumen apropiado de agua y en la solución de referencia destruir el H.M.F. esta vez con una solución de bisulfito al 0'10% (P/V), multiplicando posteriormente el factor de la absorbancia obtenida por el apropiado factor de dilución.

3.7.2.5.- Cálculos y expresión de resultados

$$\text{mg H.M.F./1000 g de miel} = (A_{284} - A_{336}) \times 149'7 \times \frac{5}{\text{g de muestra}}$$

$$\text{El factor de } 149'7 = \frac{126}{16830} \times \frac{1000}{5} \times \frac{1000}{5}$$

Donde: 126 es el peso molecular del H.M.F., 16830 el coeficiente de extinción molar del H.M.F. a 284 nm, 1000 son los mg por gramo, 10 los centilitros por litro, 5 los gramos de muestra y 1000 para expresarlos por kilo.

3.7.2.6.- Precisión

Se estudió la precisión del método realizando diez análisis de una misma muestra de miel comercial, obteniéndose los resultados de la Tabla XVII.

3.7.2.7.- Exactitud

Se utilizó el método de la sobrecarga. A la solución de miel se le añadió el equivalente en mg/Kg de 9'2, 18'4 y 27'6 respectivamente cuya riqueza fué simultáneamente comprobada mediante el método espectrofotométrico según Turnes para lo cual se prepararon sendas disoluciones de H.M.F. en agua. Tabla XVIII.

TABLA XVII.

Comprobación de la Precisión del método de White para la determinación de H.M.F.

57'6	
58'1	
58'1	
57'9	
58'0	
57'2	
57'9	
57'9	
57'0	
56'9	
<hr/>	
\bar{x}	57'7
S_{n-1}	0'460
$Cv\%$	0'79

TABLA XVIII

Evaluación de la riqueza del H.M.F. patrón

mg/100 ml	Absorbancia neta	
0'049	0'060	0'060
0'098	0'120	0'121
0'197	0'241	0'242
0'295	0'362	0'363

$$r = 0'9999907$$

$$a = 0'0001659$$

$$b = 1'2287377$$

$$\text{Riqueza en \% del H.M.F.} = \frac{1228'7 \times 126}{10 \times 16830} = 92'0$$

En la Figura 7 puede observarse el registro gráfico del espectro directo (derivada cero) de una de estas escalas.

La recuperación resultó satisfactoria pues ésta presenta un promedio del 97'2 con un coeficiente de variación por ciento del 2'12 como muestra la Tabla XIX.

La medida de este parámetro se ha efectuado en las muestras naturales tres veces a intervalos de un año y en las comerciales dos veces a ese mismo período al objeto de poder evaluar su evolución. Véanse los resultados en el capítulo correspondiente.



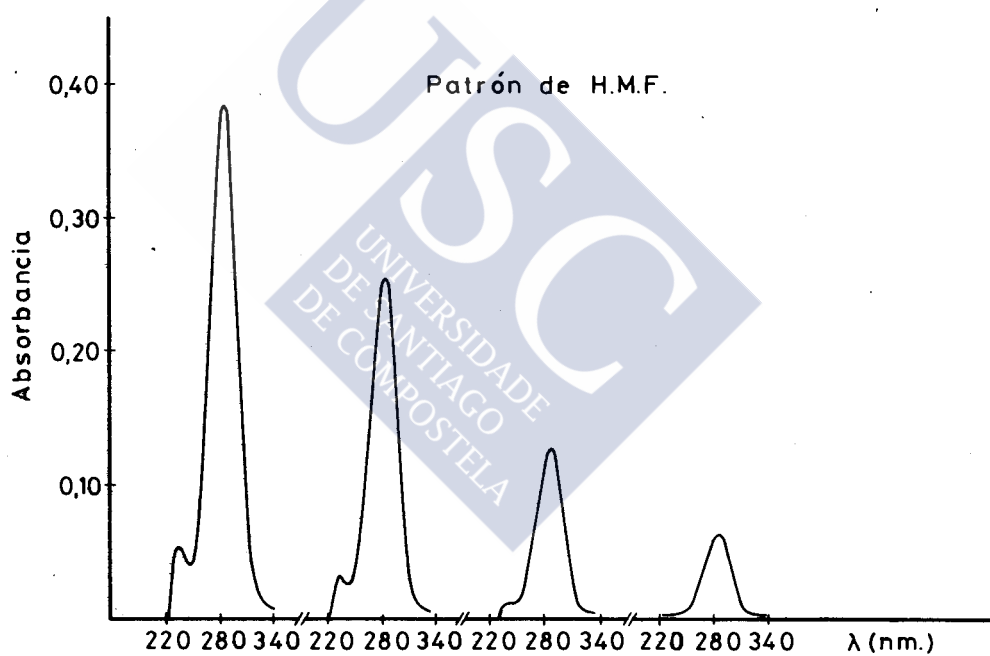


Figura 7

Registro de una escala patrón de hidroximetilfurfural.

TABLA XIX

Estudio de la recuperación del método de White para la determinación de H.M.F.

H.M.F. PRESENTE EN CADA MIEL	AÑADIDO	ENCONTRADO	RECUPERACION
	9'20	65'03	99'89
55'84	18'40	74'17	99'61
	27'60	83'93	101'76
	9'20	41'06	98'01
32'04	18'40	49'68	95'86
	27'60	58'44	95'64
	9'20	51'66	97'84
42'66	18'40	60'57	97'33
	27'60	69'42	96'94
	9'20	48'50	92'69
39'97	18'40	57'43	94'89
	27'60	66'63	96'60
	9'20	100'23	100'08
91'02	18'40	109'02	97'82
	27'60	118'08	98'04
	9'20	30'59	94'94
21'86	18'40	39'51	95'92
	27'60	48'92	98'06
	9'20	32'04	96'11
23'20	18'40	40'88	96'08
	27'60	50'12	97'54
			x 97'22
			Sn-1 2'06
			Cv% 2'12

4.- MUESTRAS, RESULTADOS Y DISCUSION





Antes de entrar en el detalle de los resultados obtenidos hemos de señalar la toma y procedencia de las muestras empleadas en este trabajo.

4.1.- MUESTRAS

En la toma de muestras de este alimento se pueden distinguir dos casos: que se trate de miel líquida (colada) o que se presente en panales. La forma de proceder en ambos casos se recoge en el apartado 6.1.3 de la Norma sobre la miel del Boletín Oficial del Estado de 1975.

Para la realización del presente estudio se han utilizado muestras de miel líquidas y coladas tanto comerciales como naturales.

Las mieles comerciales fueron adquiridas en esta localidad.

Las mieles naturales nos han sido facilitadas por el Centro Regional de Extensión Agraria de Santiago, pertenecientes a las cuatro provincias gallegas (véase mapa de la Figura 8).

4.2.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados encontrados para cada uno de los parámetros evaluados en las 24 muestras comerciales y en las 91 naturales de Galicia se hallan recogidos en las Tablas XX y XXI.

En cada una de las mieles aparecen recogidos el número de orden, su origen, para cuya toponimia se ha seguido la terminología utilizada por Miralbés, R. y col. (1979), sus características de color que incluye las coordenadas tricromáticas (x,y), la longitud de onda dominante, la pureza, y la absorbancia neta a 560 nm ($A_{560} - A_{720}$); la turbidez, el pH, la acidez libre, acidez láctica, acidez total, la relación acidez láctica/acidez

libre, el índice de formol y las cenizas. A continuación con los mismos números de orden se han incluido el contenido en agua, y la composición en azúcares (azúcares reductores totales, glucosa, fructosa, maltosa aparente, sacarosa aparente y dextrinas). También se incluyen las relaciones glucosa/agua y fructosa/glucosa, por cuanto la primera indica la tendencia a la granulación y la segunda como medida de su autenticidad. En la misma Tabla se incluye el índice de diastasa y la evolución encontrada para el H.M.F. a lo largo de dos años para las naturales y uno para las comerciales.

Al final de las Tablas tanto de las mieles comerciales como de las naturales se incluye el valor promedio y su variación con objeto de facilitar la comparación.

Así mismo se han realizado los diagramas en las Figuras 9 a 31 ambas inclusive, correspondientes a los parámetros mencionados para facilitar su discusión.

En efecto, por lo que se refiere al color podemos indicar los siguientes casos:

El promedio de la longitud de onda dominante en las mieles de Galicia es de 591 nm en tanto que en las comerciales es de 580 nm. Esto se ve análogamente en las gráficas de la Figura 9 concluyéndose que las mieles de Galicia son en general más oscuras que las comerciales analizadas. Esta circunstancia se ve corroborada al observar las gráficas de la Figura 10 que representan las absorbancias netas. Lo cual es lógico pues se ha demostrado anteriormente la fuerte correlación entre este valor y aquel.

Con relación a la pureza (Figura 11) también se encuentran diferencias en cuanto a las medidas, con una distribución más dispersa para las comerciales y más concordante para las naturales, siendo la excepción más numerosa las muestras del litoral de Pontevedra.

La luminosidad relativa (valor de y por 100) no se ha reflejado en las Tablas pues es fácilmente calcu-

lable. Su promedio para las mieles comerciales es de 45,5 en tanto que las naturales es de 41,1.

La turbidez expresada en unidades de absorbancia a 720 nm da un promedio de 0,34 en las comerciales y de 0,46 en las naturales, equivalentes ambas por extrapolación al grado "Cloudy IV" de la escala americana (véase apartado 3.1.5.). En tanto que por medio de unidades de absorbancia queda mejor establecida. Los diagramas de distribución para ambas poblaciones pueden observarse en la Figura 12.

En lo relativo a los tipos de acidez, la acidez actual o pH muestra una distribución recogida en la Figura 13, con un promedio de 4,1 para las comerciales y de 4,3 para las naturales, mostrando éstas últimas una variación más alta. La acidez libre muestra una distribución representada en la Figura 14; como se puede observar el promedio de las comerciales es de 22,5, inferior a la de las naturales: 34,4.

La acidez láctica, Figura 15, da un promedio de 5,4 y de 5,7 respectivamente. La acidez total sin embargo muestra la lógica diferencia en favor de las naturales.

La relación acidez láctica/acidez libre mencionada por White, J.W.Jr. (1962) como un indicador de la calidad, da un promedio de 0,25 para las comerciales mientras que en las naturales éste se sitúa en 0,16 en virtud de su más alto denominador, lo que puede observarse en las gráficas de la Figura 16.

En las mieles comerciales el índice de formol promedio es de 0,67, mientras que en las naturales es de 1,1. Encontrándose valores inferiores a los mencionados en la bibliografía en dos casos de las comerciales y en uno de las naturales; por encima de 1,55 también se encuentran valores en las muestras naturales. La distribución de estos resultados puede verse en la Figura 17.

En la columna siguiente aparecen los valores encontrados para las cenizas, obteniéndose un promedio 0,19 y 0,41 respectivamente para las muestras comerciales y

naturales. La distribución de este parámetro aparece recogido en la Figura 18, la cual tiene similitud con el color y la acidez demostrando sus correlaciones.

El contenido en agua presenta un promedio para las comerciales de 16,9 y con un Cv% de 4,8 mientras que en las naturales el promedio es de 18,5 y el Cv% de 9,4. Quizás debemos señalar que las muestras del interior de Orense presentan un menor contenido en ésta. Clasificando por el contenido en agua las mieles comerciales a excepción de la 4 están comprendidas en los grados A y B mientras que las naturales 55 en los grados A y B, 24 del grado C y 12 del grado D. La distribución puede observarse en la Figura 19.

Los azúcares reductores muestran un valor promedio de 73,7 en las comerciales y una variación por cien de 2,8; para las naturales estos valores son 69,9 de promedio y una variación de 3,3, encontrándose sólo la muestra número 64 con un valor de 64,1 lo que unido al alto valor en cenizas, color, etc, hacen pensar en una miel claramente de mielada o mezcla de miel floral con miel de mielada. En la Figura 20 aparece la distribución de estos resultados.

El valor del tanto por ciento de glucosa en las mieles comerciales es de 31,5, en tanto que en las naturales éste es de 25,5 con unas variaciones del 8 y del 10% respectivamente, lo que recoge la Figura 21. Estos valores hacen pensar de nuevo en mieles de mielada según McGregor.

La fructosa presenta un promedio para las mieles comerciales de 38,3 y en las naturales de 37,4. La distribución de ambas no muestra una diferencia notoria (véase Figura 22).

En el caso de la maltosa aparente los promedios se distancian de forma que para las comerciales aparece 6,2 y en las naturales alcanza el 11,0. La distribución de estos valores se puede observar en la Figura 23.

La sacarosa da un promedio de 1,7 con una fuerte variación del 50% en las comerciales en tanto que en las

naturales se observa un promedio de 1,1 con una variación más alta, 77%. Su distribución puede observarse en las gráficas de la Figura 24.

Las dextrinas han dado un promedio de 1,7 con una alta variación del orden del 61% para las muestras comerciales, y de 3,4 de promedio con una variación del 36% en las naturales. Estos resultados confirman más aún que las mieles naturales analizadas en su mayor parte son mezcla de miel de mielada y miel de flores, dado que muchas de ellas superan el 2% en dextrinas y su contenido en cenizas es alto. Véase la Figura 25.

La tendencia a la granulación, según White, J.W.Jr. (1978) predecible por la relación glucosa/agua da un promedio para las comerciales de 1,9 encontrando las muestras números 5, 6 y 14 con valores inferiores a 1,7 manteniéndose fluídas durante su almacenamiento, las restantes han granulado. Con relación a las naturales este índice es más bajo, promedio 1,4, y prácticamente sólo 5 han iniciado su granulación: las números 7, 26, 31, 51 y 71 (Figura 26).

Otra relación interesante en el estudio de calidad de la miel es la relación fructosa/glucosa que muestra un promedio de 1,22 con una variación de cerca del 7% para las comerciales. En las naturales, habida cuenta del bajo contenido en glucosa ya comentado se obtiene un valor promedio de 1,48 siendo su oscilación del 11%. Esta circunstancia se puede ver reflejada en las gráficas de las Figuras 27 y 28. La línea continua diagonal representa la relación fructosa/glucosa igual a 1, no encontrándose ninguna de las muestras analizadas por debajo de ella.

El índice de diastasa da un promedio de 14,5 para las muestras comerciales y de 24,3 en las naturales mostrando en ambos casos una amplia variación. Este parámetro permite como es sabido evaluar el correcto procesamiento y conservación. Dentro de las comerciales las muestras números 2, 4, 7, 10, 20 y 22 presentan valores inferiores al mínimo que exige la Legislación, en tanto que dentro de las naturales la 2, 5, 6 y 57 sólo muestran así mismo

unos valores inferiores al legislado (Figura 29).

El contenido en hidroximetilfurfural, como es lógico, también es más alto en estas mieles de menor índice de diastasa dado que este valor se incrementaría por un calentamiento o almacenamiento excesivo. De tal manera en las muestras comerciales sobrepasan el valor de 40 mg/Kg los números: 2, 4, 7, 10, 18, 20 y 22. Esta última con una cifra de diastasa de 8,1 rozaba el límite legal inferior. Entre las naturales sólo la número 57 muestra un valor de 44,1 mg/Kg, las otras muestras naturales apuntadas con bajo índice de diastasa cumplen este requisito, lo que podía indicar su baja actividad diastásica, no por calentamiento.

La evaluación de valor en hidroximetilfurfural de las muestras comerciales y naturales realizada en el mes de Julio (Figura 30), parece relacionarse con el pH. Globalmente esta evaluación puede observarse representando promedios frente al tiempo transcurrido en años. Véase la gráfica de la Figura 31 en la que la línea discontinua representa las muestras comerciales en las que se obtiene una recta $y = 17,4 x + 16,9$ y para las naturales con un coeficiente de correlación $r = 0,999997$ y una ecuación $y = 10,0 x + 3,8$ que indican que la pendiente es más elevada en las comerciales donde el promedio de pH es más ácido. Individualmente se puede constatar como mieles con bajo pH observan un mayor incremento en el contenido de hidroximetilfurfural.

TABLA XX MIELES COMERCIALES

ORIGEN SOCIAL	CARACTERISTICAS DEL COLOR					TURBIDEZ	ACIDEZ					Indice de formol	Cenizas	CONTENIDO EN AGUA	AZUCARES						GLUCOSA AGUA	FRUCTOSA GLUCOSA	INDICE DE DIASTASA
	x	y	Longitud de onda dominante	Pureza	A ₅₅₀ -A ₇₂₀		pH	Acidez libre	Acidez láctónica	Acidez total	Acidez láctónica Acidez libre				AZUCARES REDUCTORES	GLUCOSA	FRUCTOSA	"MALTOSA"	SACAROSA	DEXTRINAS			
A	0'560	0'424	589'0	94'7	0'743	0'331	4'3	23'86	5'82	29'68	0'244	0'80	0'17	16'5	73'3	29'7	41'1	4'4	0'8	3'5	1'80	1'38	18'8
ONA	0'484	0'462	579'5	83'4	0'304	0'211	4'1	22'70	5'33	28'03	0'235	0'51	0'12	17'0	72'5	28'9	36'6	10'9	0'5	2'8	1'70	1'27	6'4
ONA	0'462	0'456	587'4	76'2	0'289	0'708	4'2	17'65	4'76	22'41	0'270	0'56	0'18	17'0	73'4	29'4	37'4	10'3	1'1	1'6	1'73	1'27	18'2
ONA	0'502	0'476	580'0	92'4	0'257	0'174	3'9	21'23	6'20	27'43	0'292	0'58	0'12	18'6	74'2	34'1	36'6	5'5	0'8	0'7	1'83	1'07	5'7
ONA	0'540	0'442	588'6	93'9	0'549	0'349	4'8	27'54	2'55	30'09	0'093	0'86	0'35	17'4	71'1	26'6	36'4	12'6	0'3	3'3	1'53	1'37	16'7
ONA	0'547	0'436	587'0	93'4	0'599	0'308	4'7	39'80	3'99	43'09	0'102	1'18	0'51	16'2	67'1	23'7	33'9	14'7	2'7	4'2	1'46	1'43	24'0
ONA	0'438	0'451	576'4	68'8	0'188	0'122	3'9	16'29	3'89	20'18	0'239	0'25	0'05	18'3	71'3	31'2	37'8	3'8	2'7	0'5	1'70	1'21	2'3
ONA	0'416	0'437	575'5	59'6	0'151	0'109	4'0	19'02	6'01	25'03	0'316	0'50	0'11	17'3	72'8	31'8	36'9	6'5	3'4	0'7	1'84	1'16	12'8
ONA	0'461	0'470	576'9	79'8	0'168	0'184	3'9	23'02	8'32	31'34	0'361	0'65	0'14	16'1	75'0	34'0	39'3	4'4	2'8	0'6	2'11	1'16	8'2
ONA	0'450	0'463	576'6	75'5	0'183	0'170	4'0	16'18	5'24	21'42	0'324	0'38	0'11	16'3	74'5	32'3	38'6	5'8	0'8	0'6	1'98	1'20	6'7
ONA	0'484	0'468	579'2	85'8	0'270	0'750	4'0	25'85	5'82	31'67	0'225	0'81	0'19	16'3	75'6	32'4	39'3	6'2	1'1	1'6	1'99	1'21	17'5

MAPA DE GALICIA

(DE LOS PUNTOS DE MUESTREO DE LAS MIELES NATURALES)

Figura 8

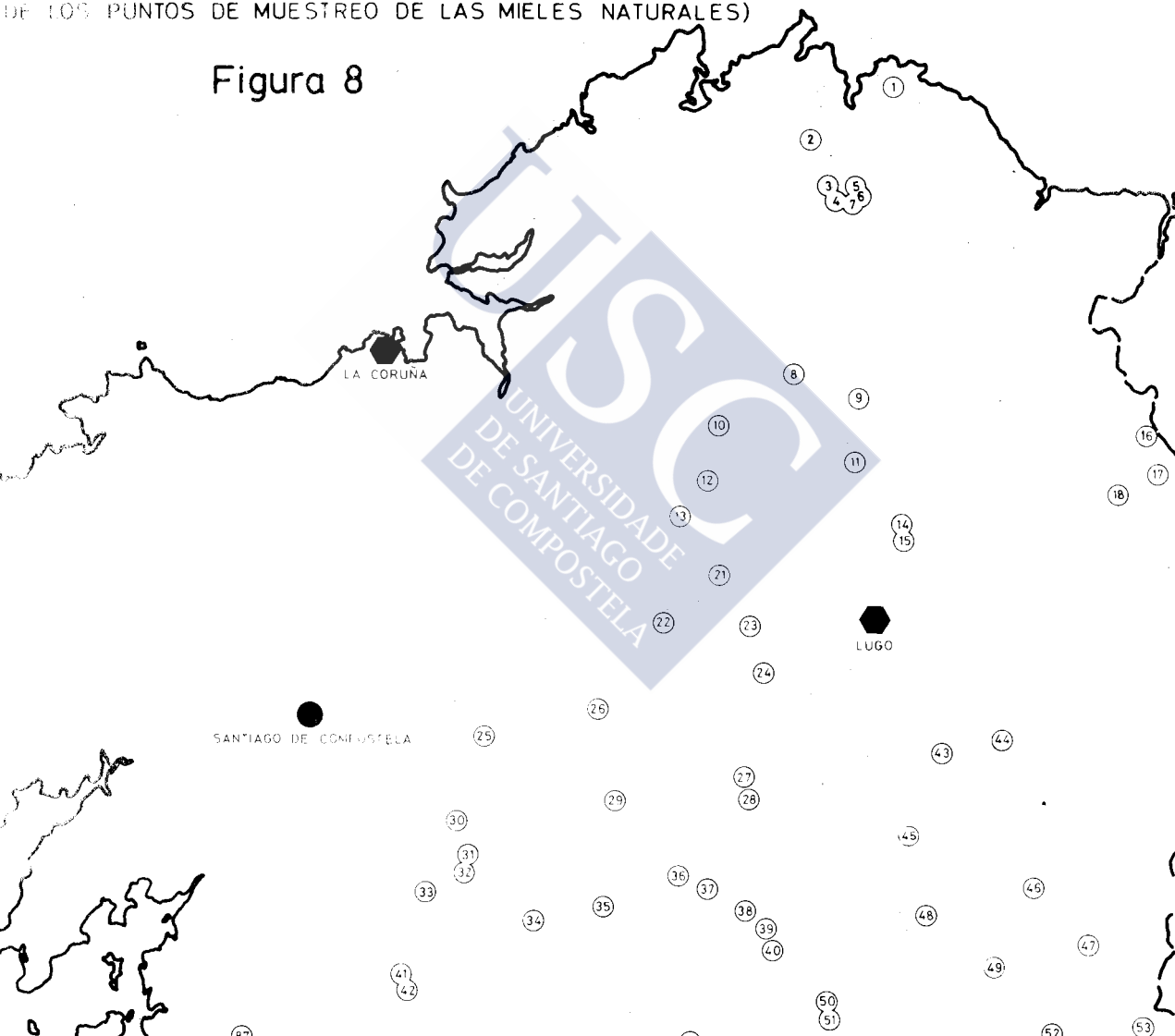


TABLA XXI MIELES NATURALES (Continúa)

ORIGEN	CARACTERISTICAS DEL COLOR					TURBIDEZ	ACIDEZ					Indice de Formol	Cenizas	CONTENIDO EN AGUA	AZUCARES						GLUCOSA AGUA	FRUCTOSA GLUCOSA	INDICE DE DIASTASA
	x	y	Longitud de onda dominante	Pureza	A ₅₆₀ -A ₇₂₀		pH	Acidez libre	Acidez láctónica	Acidez total	Acidez láctónica Acidez libre				AZUCARES REDUCTORES	GLUCOSA	FRUCTOSA	"MALTOSA"	SACAROSA	DEXTRINAS			
LEON - CABANAS	0'511	0'433	584'7	83'2	0'595	0'198	3'7	43'08	13'53	56'61	0'314	0'71	0'16	20'7	71'0	29'5	40'7	1'8	0'5	1'0	1'43	1'38	11'7
	0'618	0'380	587'4	97'5	1'118	0'793	3'8	44'40	11'88	56'28	0'268	0'64	0'20	18'6	73'5	28'2	43'6	3'3	0'8	1'2	1'52	1'55	6'5
	0'611	0'384	596'4	96'6	1'024	0'214	3'6	49'46	14'41	63'87	0'291	0'66	0'21	19'9	72'8	26'8	45'9	1'1	0'7	1'5	1'35	1'71	8'0
	0'567	0'421	589'3	94'4	0'704	0'253	3'7	38'11	12'65	50'76	0'332	0'76	0'20	18'3	73'1	28'1	42'2	4'9	1'0	0'9	1'54	1'50	9'6
	0'647	0'351	604'5	97'9	1'555	0'475	3'8	46'52	12'18	58'70	0'262	0'52	0'20	20'2	72'2	25'6	44'8	3'6	1'2	1'5	1'27	1'75	5'1
	0'641	0'356	603'2	97'4	1'463	0'422	3'6	47'44	11'21	58'65	0'231	0'66	0'18	20'0	72'6	26'2	43'3	5'5	1'5	1'6	1'31	1'65	5'0
	0'552	0'433	587'2	93'7	0'598	0'176	4'0	33'47	11'98	45'45	0'358	0'64	0'30	17'1	72'9	29'7	41'8	2'6	0'7	2'1	1'74	1'41	17'4
SANTABALLA (LUGO)	0'542	0'446	585'4	94'5	0'500	0'231	4'6	23'01	4'67	27'68	0'203	1'01	0'59	18'9	70'1	24'4	37'9	12'2	0'2	4'5	1'29	1'55	33'3
(LUGO)	0'536	0'445	585'2	92'6	0'496	0'274	3'8	46'63	9'80	56'43	0'210	1'38	0'21	19'8	69'5	28'5	37'3	6'1	0'9	1'7	1'44	1'31	21'3
- BURIZ (LUGO)	0'600	0'396	594'3	96'8	0'958	0'424	4'1	45'81	7'71	53'52	0'168	1'91	0'40	22'3	66'7	24'0	35'6	11'2	0'6	2'9	1'08	1'48	27'0
PINO (LUGO)	0'535	0'457	583'8	94'8	0'428	0'373	4'1	32'64	9'33	41'97	0'286	1'06	0'36	18'2	71'1	29'1	35'6	10'0	0'5	3'7	1'60	1'22	33'7
- LAGOSTELLE (LUGO)	0'535	0'445	585'0	92'3	0'526	0'662	4'0	36'29	8'47	44'76	0'233	1'06	0'36	18'7	70'2	24'8	38'1	11'6	1'2	3'5	1'33	1'54	24'0
- MARIZ (LUGO)	0'592	0'405	592'7	97'0	0'881	0'904	3'8	65'37	15'12	80'49	0'231	1'93	0'31	20'1	72'2	28'5	39'2	6'3	0'5	1'7	1'42	1'38	17'5

TABLA XXI MIELES NATURALES (Continúa)

ORIGEN	CARACTERISTICAS DEL COLOR					TURBIDEZ	ACIDEZ					Indice de formol	Cenizas	CONTENIDO EN AGUA	AZUCARES						GLUCOSA AGUA	FRUCTOSA GLUCOSA	INDICE DE DIASTASA
	x	y	Longitud de onda dominante	Pureza	A ₅₆₀ -A ₇₂₀		pH	Acidez libre	Acidez láctónica	Acidez total	Acidez láctónica Acidez libre				AZUCARES REDUCTORES	GLUCOSA	FRUCTOSA	"MALTOSA"	SACAROSA	DEXTRINAS			
TEVEDRA)	0'544	0'432	587'0	91'1	0'595	0'193	3'8	49'06	13'13	62'19	0'268	1'11	0'24	18'4	74'0	30'6	40'0	5'5	0'6	1'4	1'66	1'31	24'2
TEVEDRA)	0'541	0'444	585'6	93'3	0'508	0'342	4'3	24'63	5'05	29'68	0'205	0'80	0'30	18'7	71'0	26'5	37'7	10'8	1'4	3'2	1'42	1'42	16'9
TEVEDRA)	0'558	0'435	587'6	95'6	0'595	0'347	4'0	46'52	6'95	53'47	0'149	1'30	0'38	18'7	71'6	28'8	35'6	8'4	1'0	3'0	1'54	1'24	32'3
TEVEDRA)	0'634	0'362	600'8	97'3	1'367	0'521	4'2	36'08	7'61	43'69	0'211	0'96	0'37	18'3	72'9	27'5	39'9	8'8	1'0	2'1	1'50	1'45	8'2
TEVEDRA)	0'595	0'398	593'9	95'9	1'066	0'508	4'8	29'19	1'72	30'91	0'059	1'26	0'60	18'4	69'6	23'8	35'4	16'1	1'0	4'6	1'29	1'49	33'7
UGO)	0'566	0'424	589'1	95'1	0'730	0'411	4'8	25'95	1'24	27'19	0'048	1'25	0'55	18'2	69'1	23'8	36'0	14'5	0'4	4'3	1'31	1'51	24'6
UGO)	0'556	0'429	588'1	93'8	0'716	0'285	4'5	25'75	3'24	28'99	0'126	1'04	0'41	18'9	69'0	24'7	36'9	11'6	0'9	3'6	1'31	1'49	26'8
ANTADA UGO)	0'615	0'380	597'4	96'3	1'194	0'427	4'3	50'13	6'01	56'14	0'120	1'67	0'52	16'9	70'3	26'6	36'1	11'8	1'2	3'5	1'57	1'36	31'2
UGO)	0'576	0'416	590'6	95'7	0'774	0'307	4'5	34'26	4'12	38'38	0'120	1'35	0'44	17'2	68'6	22'8	36'7	14'4	1'1	4'2	1'33	1'61	33'7
TEVEDRA)	0'452	0'462	576'6	74'8	0'199	0'136	4'3	17'03	3'62	20'65	0'213	0'59	0'26	17'2	71'3	24'8	37'3	14'4	1'0	3'8	1'44	1'50	23'4
TEVEDRA)	0'652	0'348	605'7	98'2	1'650	0'970	4'0	62'64	16'07	78'71	0'257	0'90	0'41	20'7	66'2	22'7	34'8	13'6	0'4	3'3	1'10	1'53	25'4
0)	0'538	0'442	586'7	89'6	0'565	0'554	4'0	45'52	9'24	54'76	0'203	1'10	0'24	18'2	71'6	28'4	36'6	10'3	1'9	1'6	1'56	1'29	35'7

TABLA XXI MIELES NATURALES (Y Continuación)

[illegible]

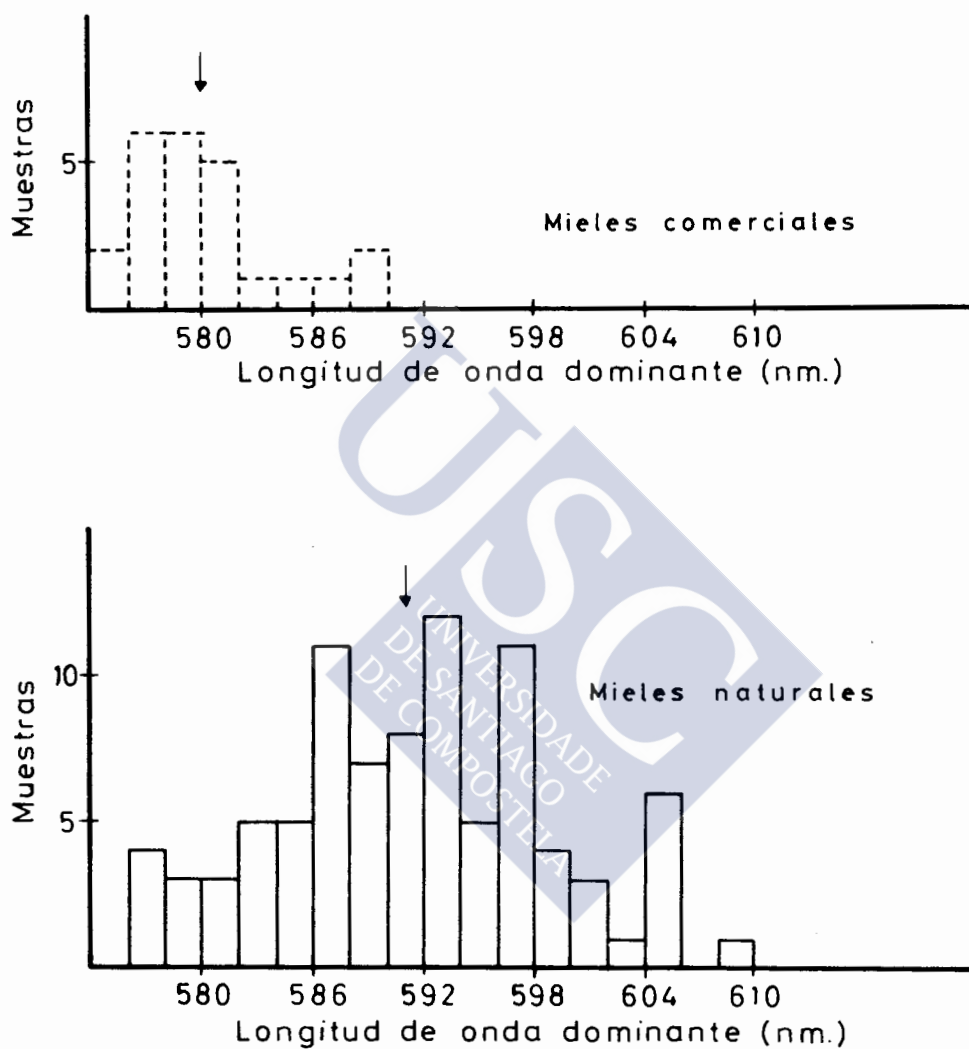


Figura 9

Distribución de los resultados encontrados para la longitud de onda dominante (nm). La flecha indica el valor promedio.

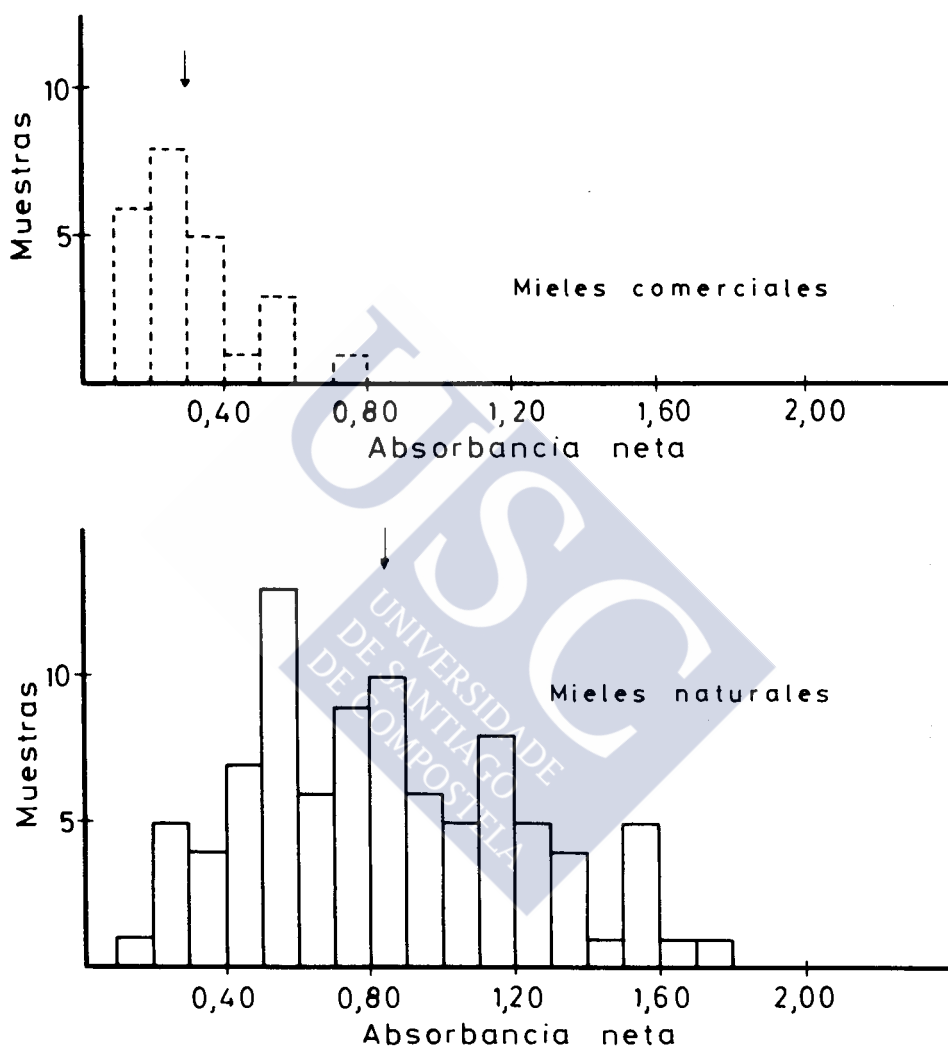


Figura 10

Distribución de los resultados encontrados para la absorbancia neta ($A_{560} - A_{720}$). La flecha indica el valor promedio.

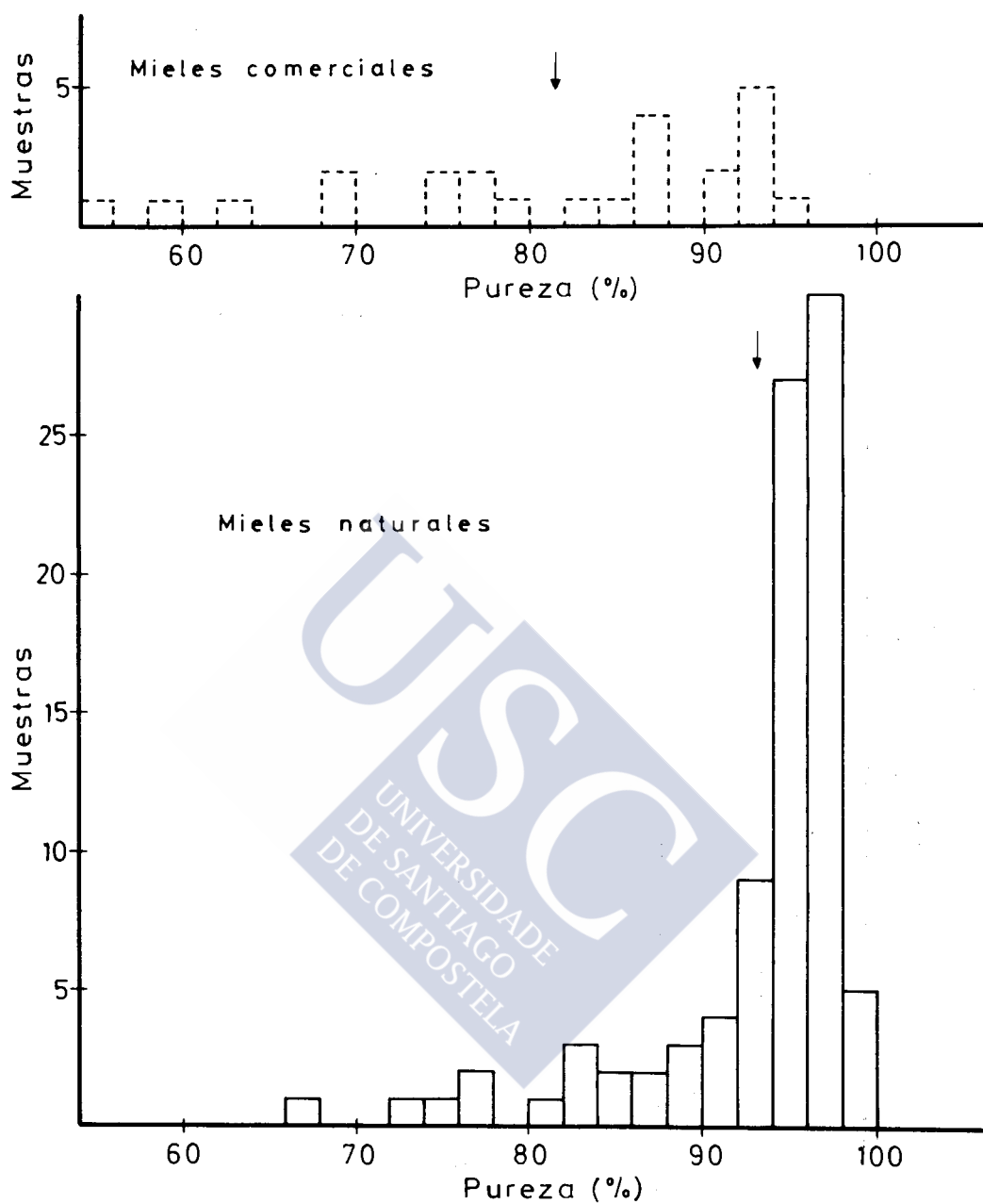


Figura 11

Distribución de los resultados encontrados para la pureza cromática. La fecha indica el valor promedio.

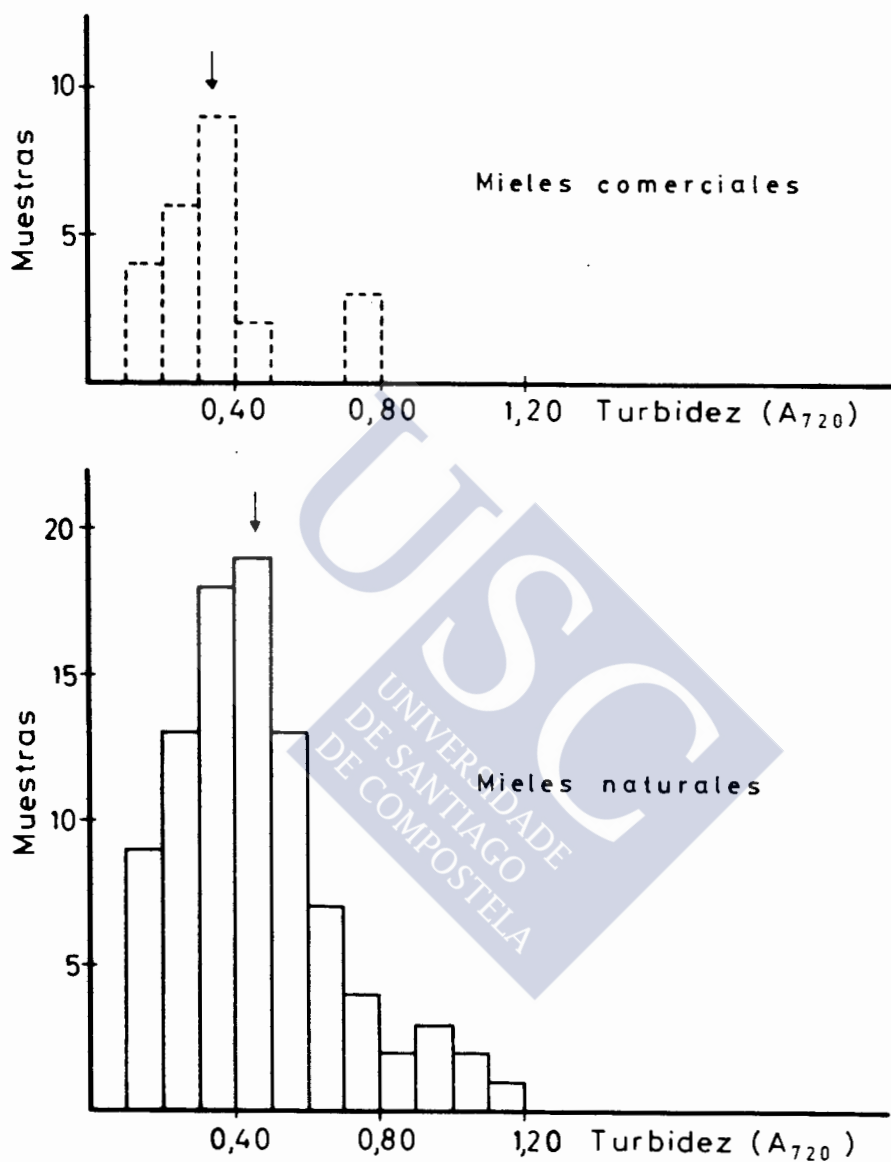


Figura 12

Distribución de los resultados encontrados para la turbidez (A_{720}). La fecha indica el valor promedio.

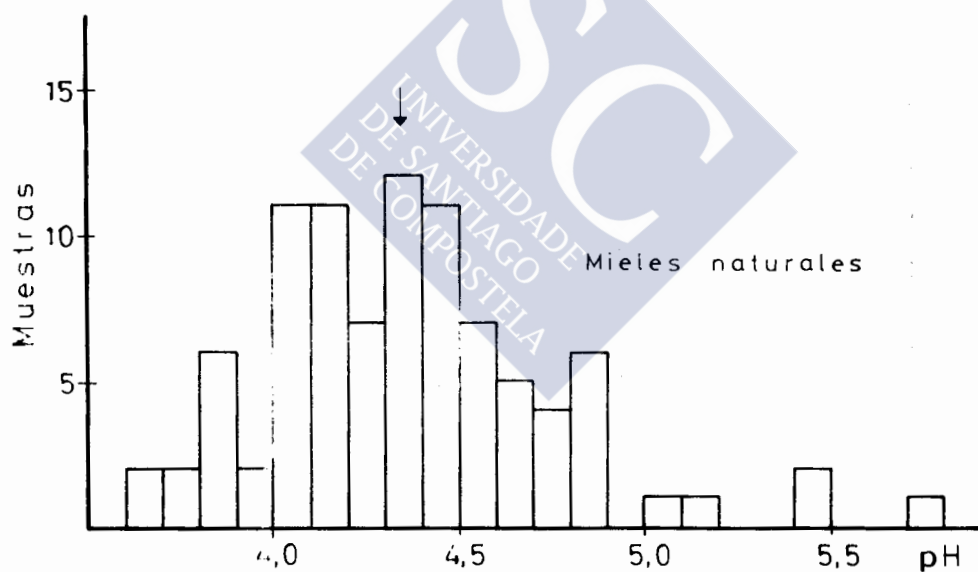
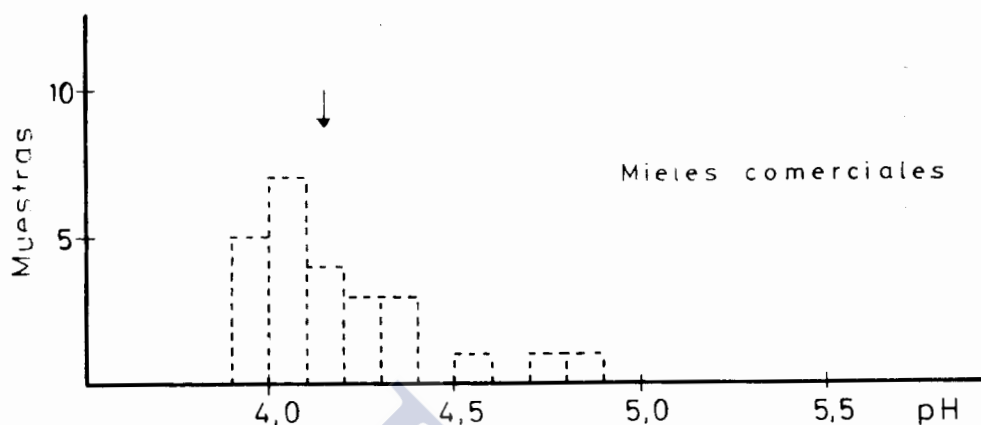


Figura 13

Distribución de los resultados encontrados para el pH.
La flecha indica el valor promedio.

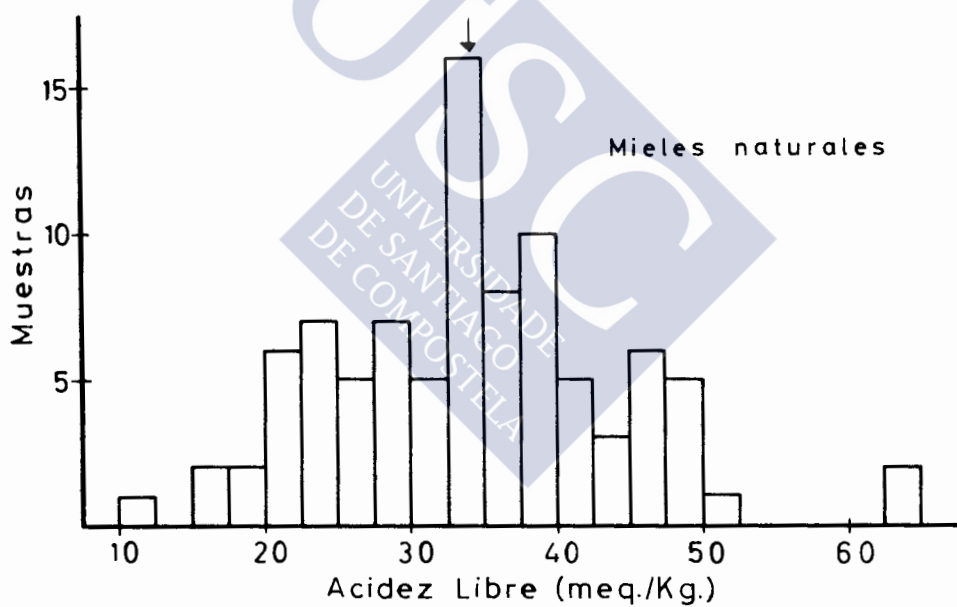
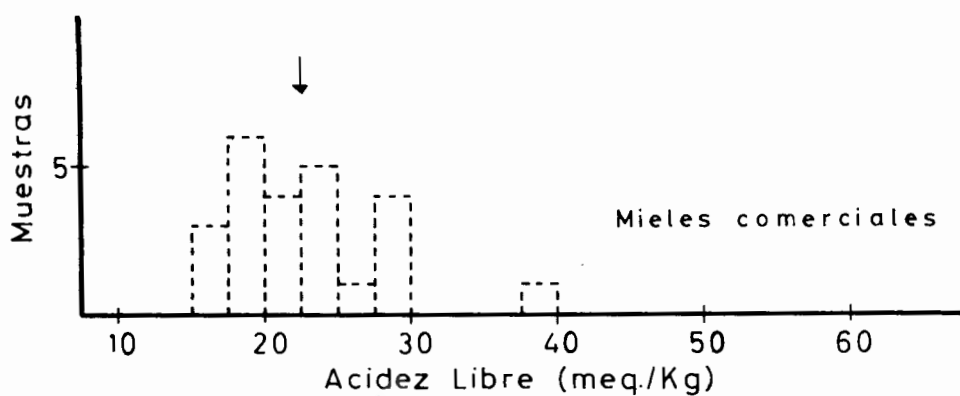


Figura 14

Distribución de los resultados encontrados para la acidez libre (meq./Kg). La flecha indica el valor promedio.

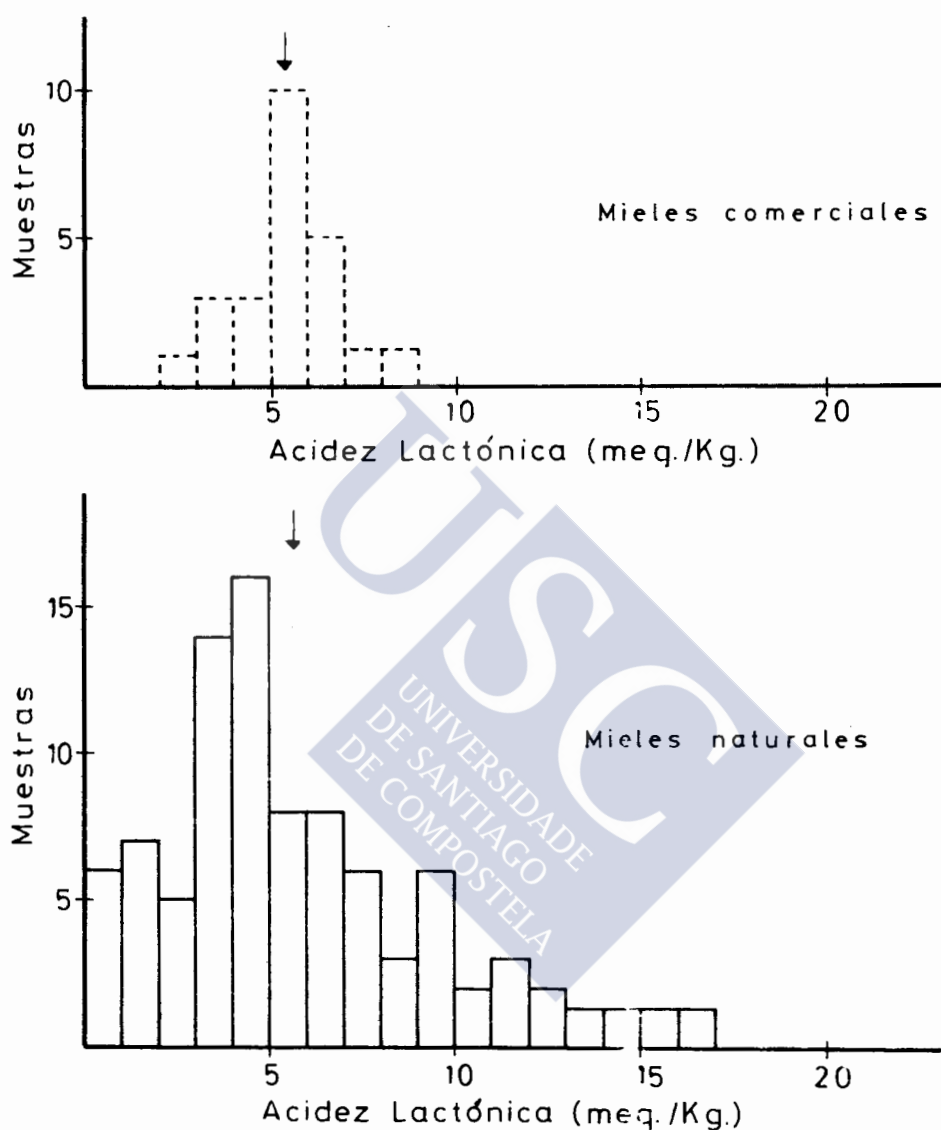


Figura 15

Distribución de los resultados encontrados para la acidez láctónica (meq./Kg). La flecha indica el valor promedio.

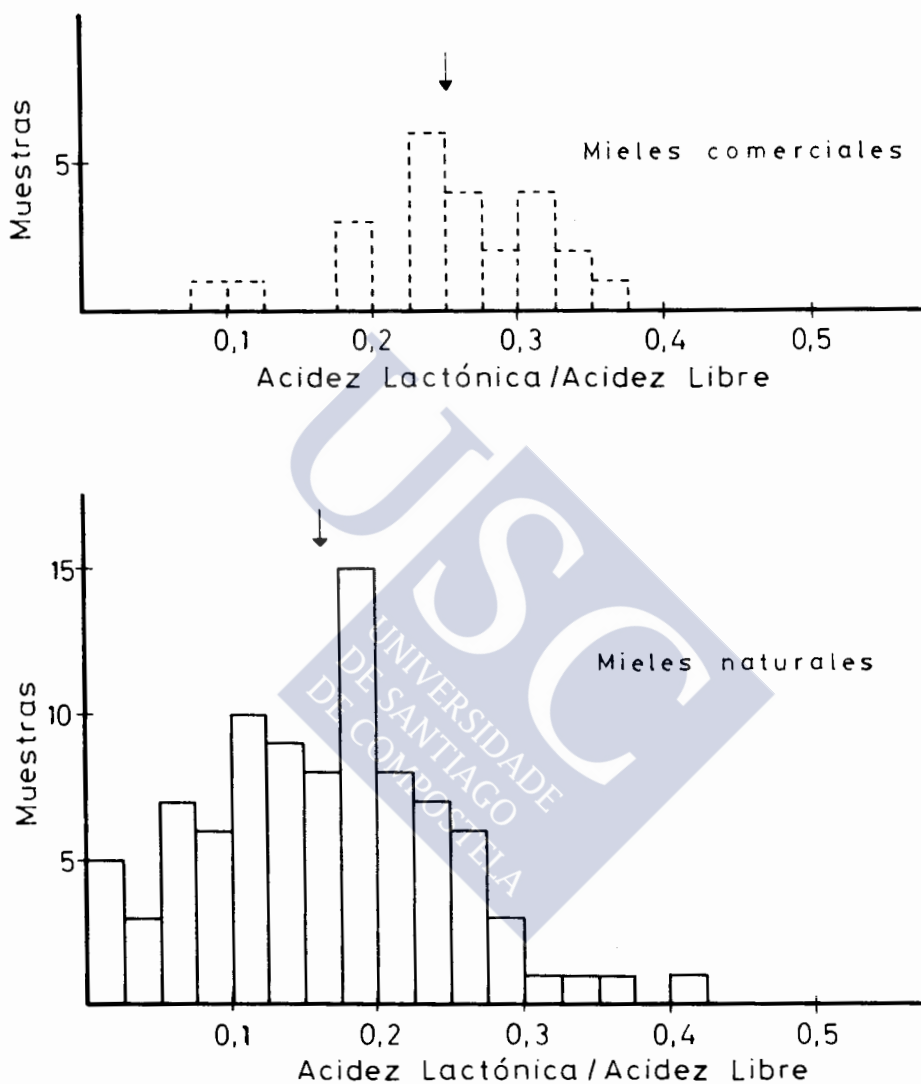


Figura 16

Distribución de los resultados encontrados para la acidez lactónica/acidez libre. La flecha indica el valor promedio.

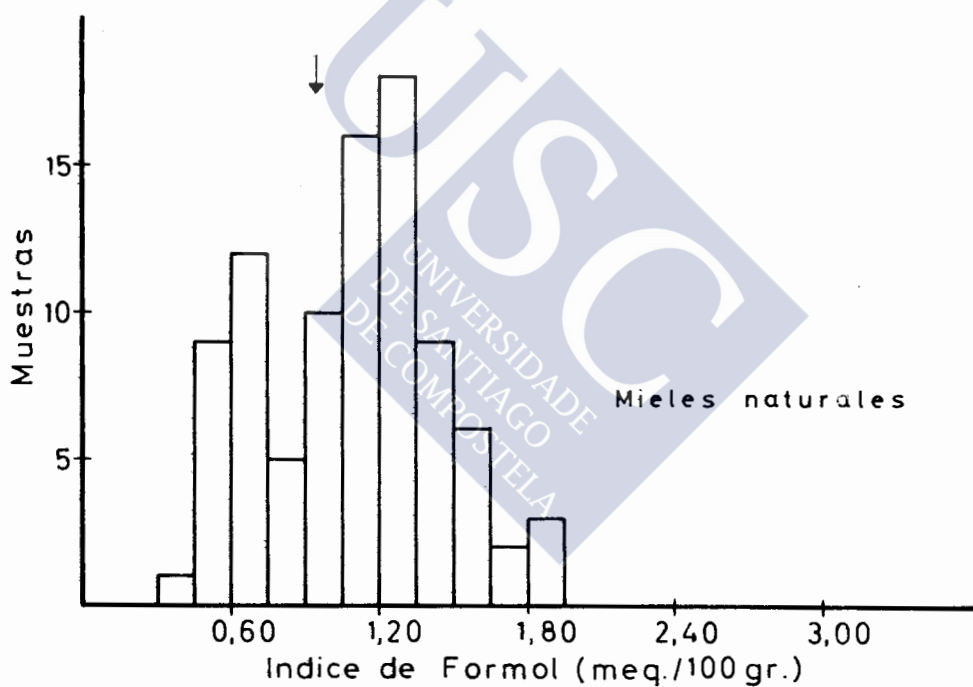
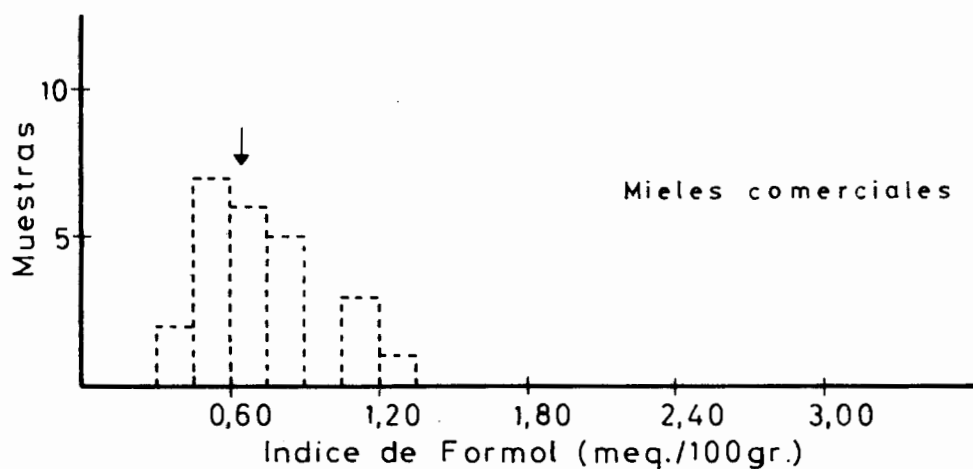


Figura 17

Distribución de los resultados encontrados para el índice de formol (meq./100 g). La flecha indica el valor promedio.

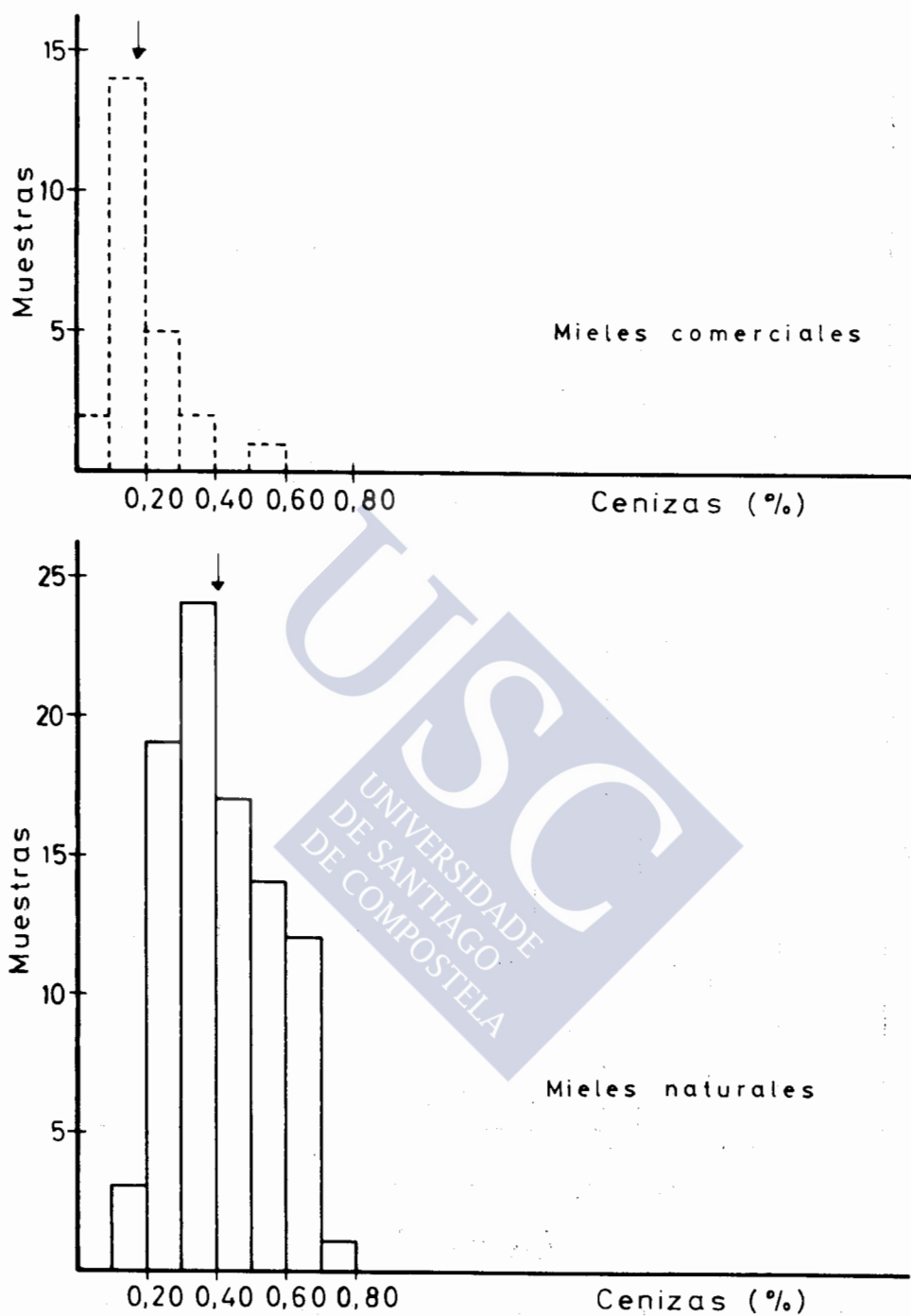


Figura 18

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en cenizas (%). La flecha indica el valor promedio.

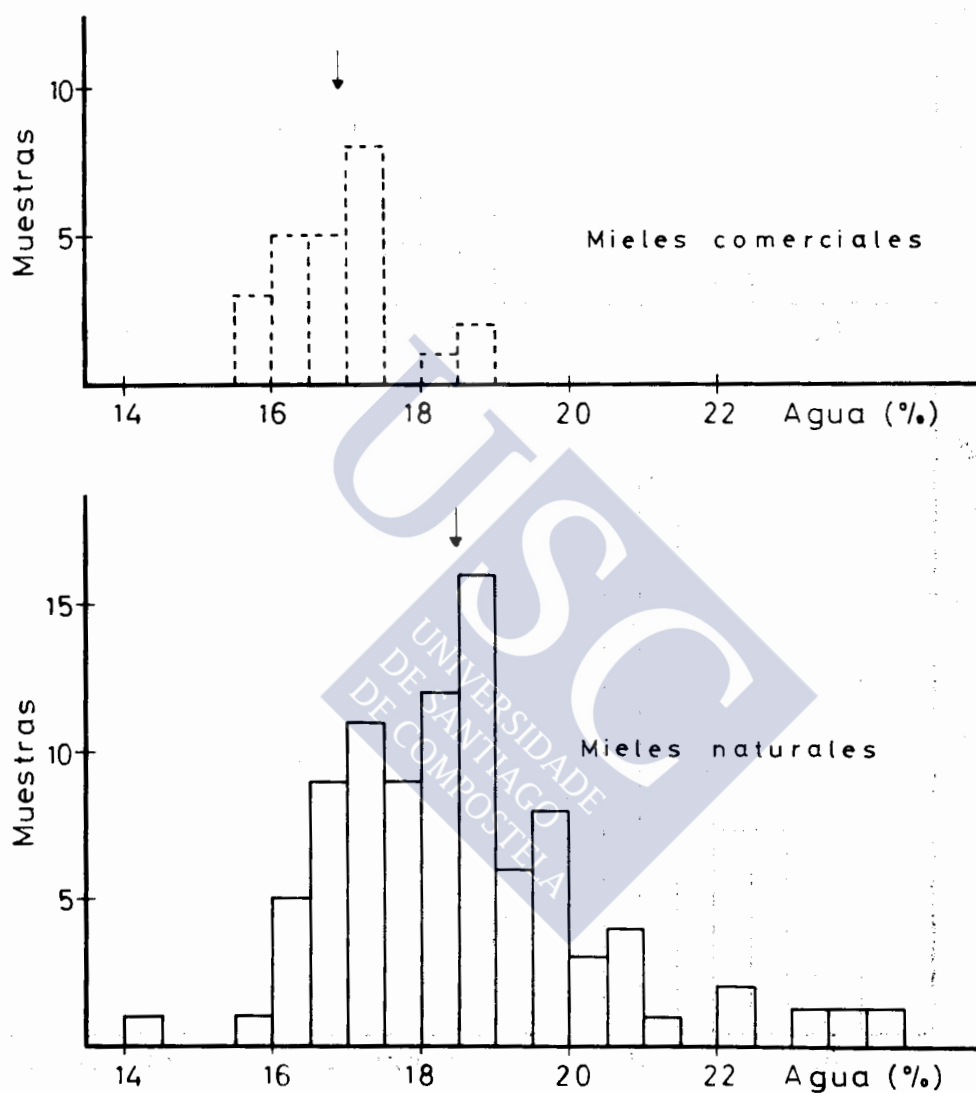


Figura 19

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en agua (%). La flecha indica el valor promedio.

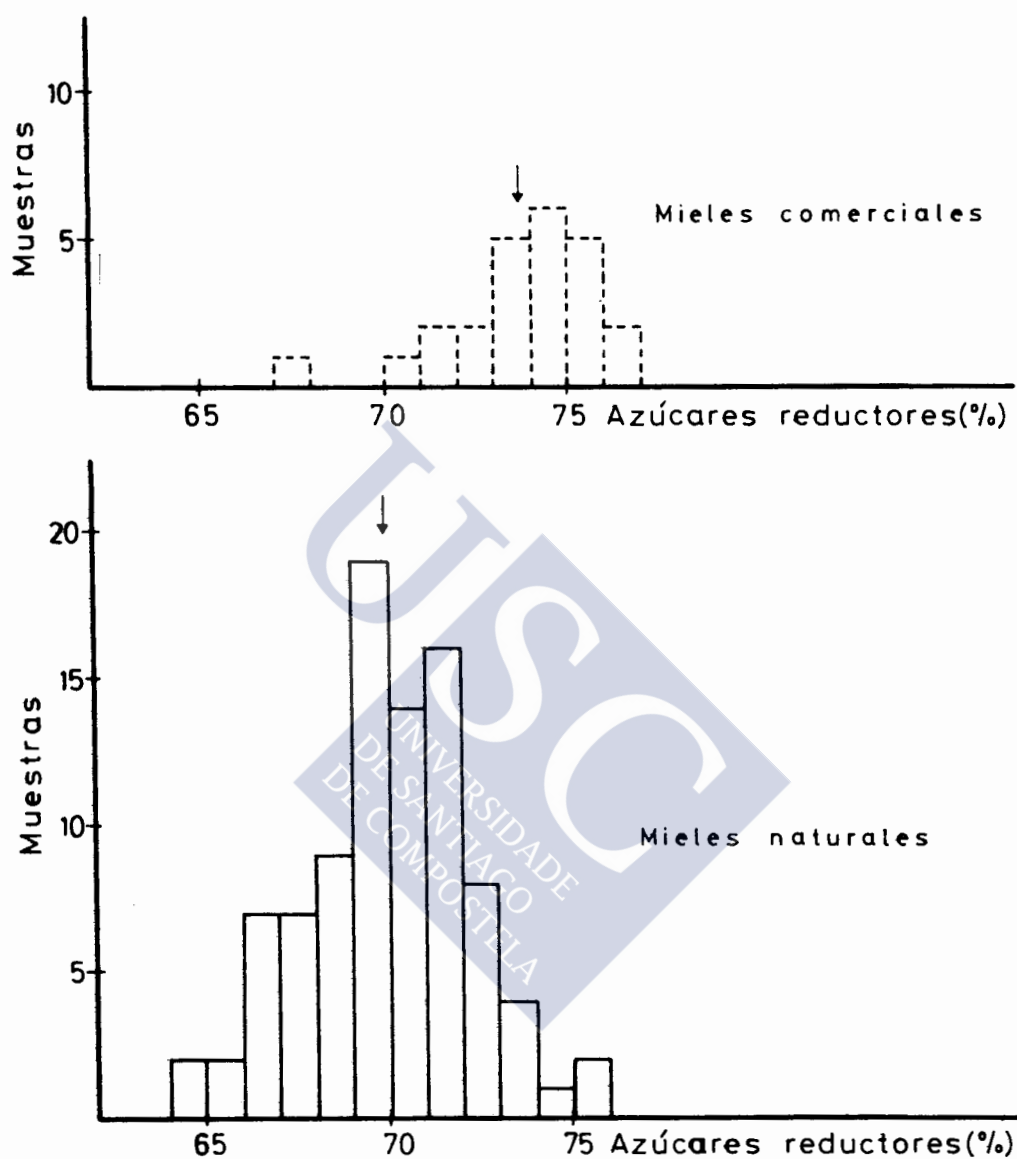


Figura 20

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en azúcares reductores (%). La flecha indica el valor promedio.

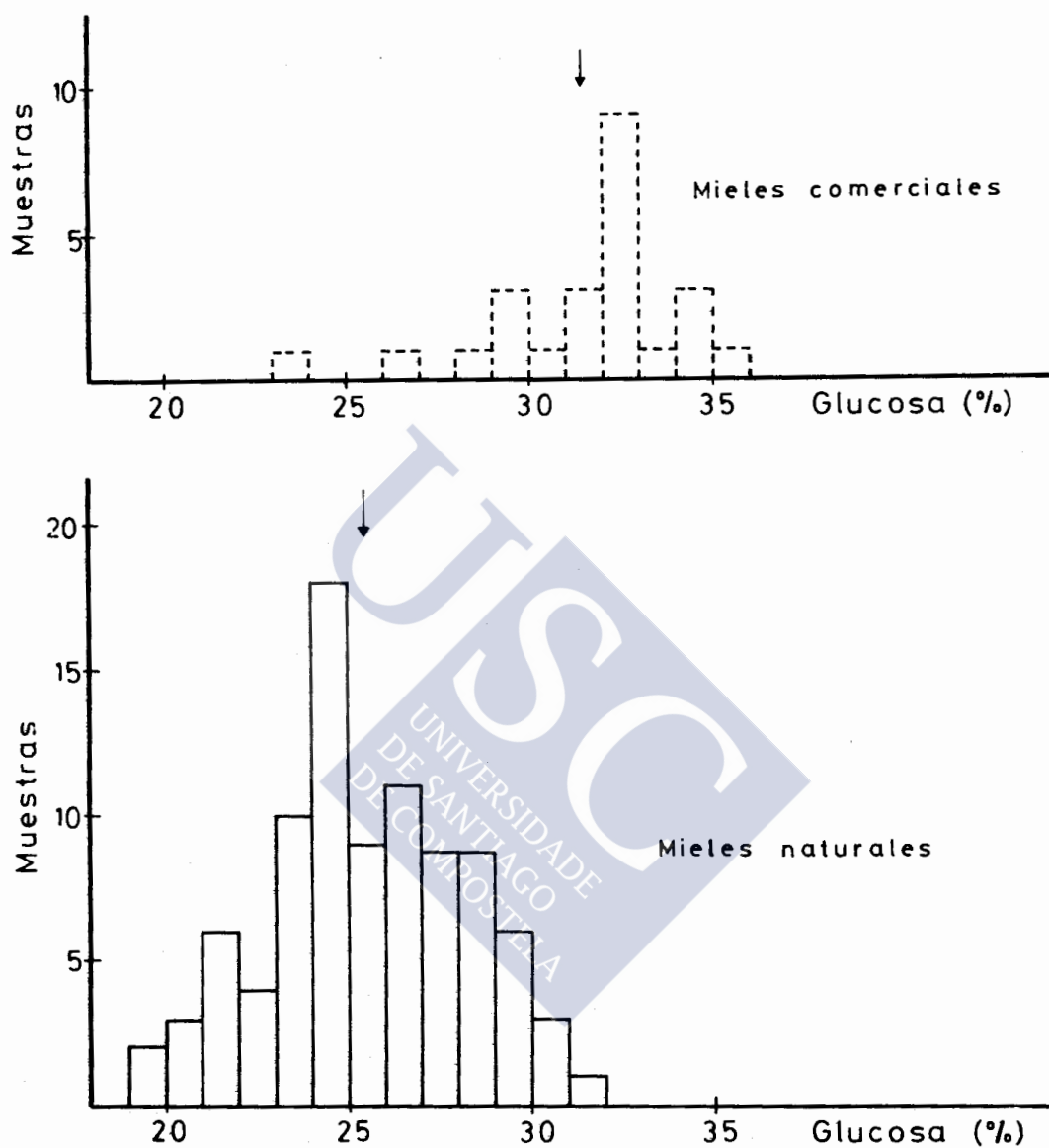


Figura 21

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en glucosa (%). La flecha indica el valor promedio.

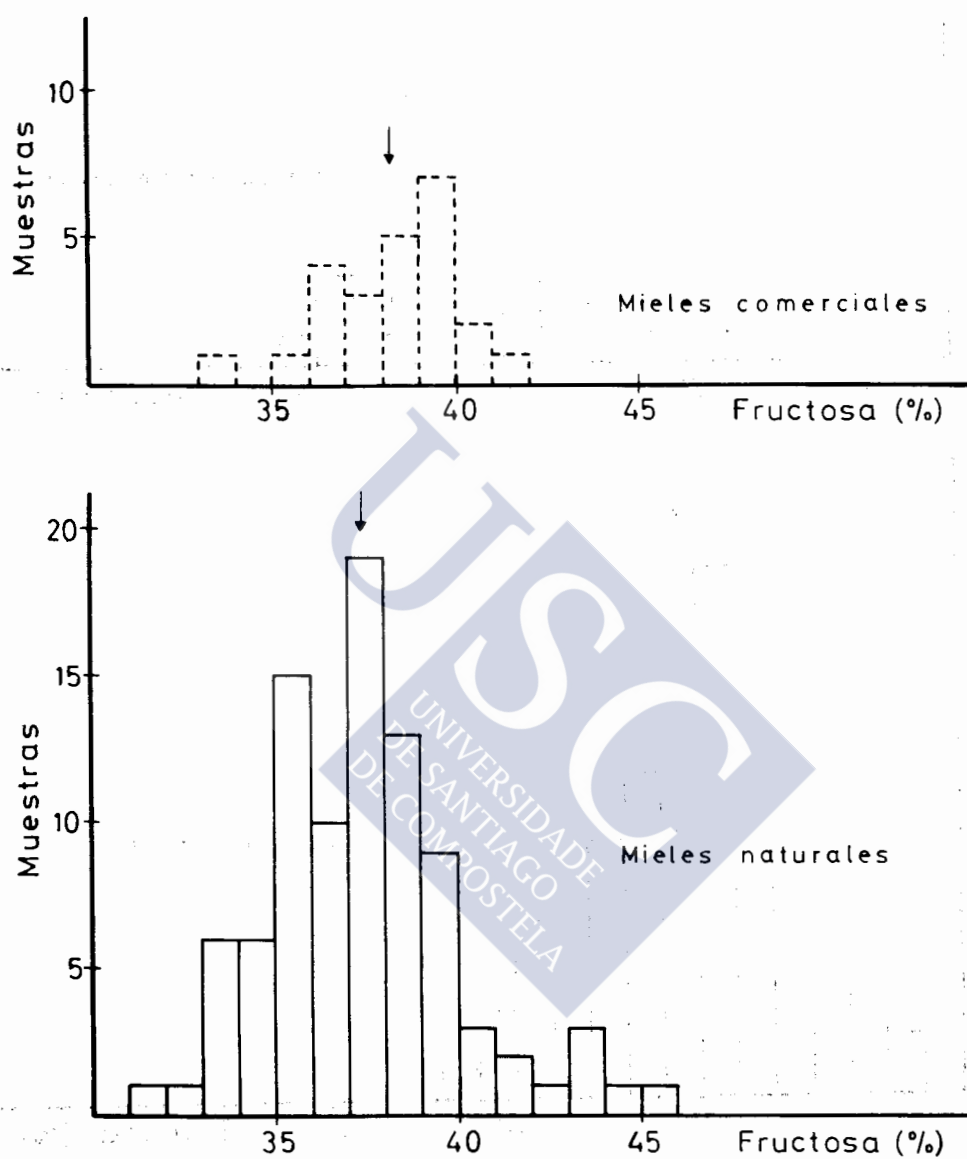


Figura 22

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en fructosa (%). La flecha indica el valor promedio.

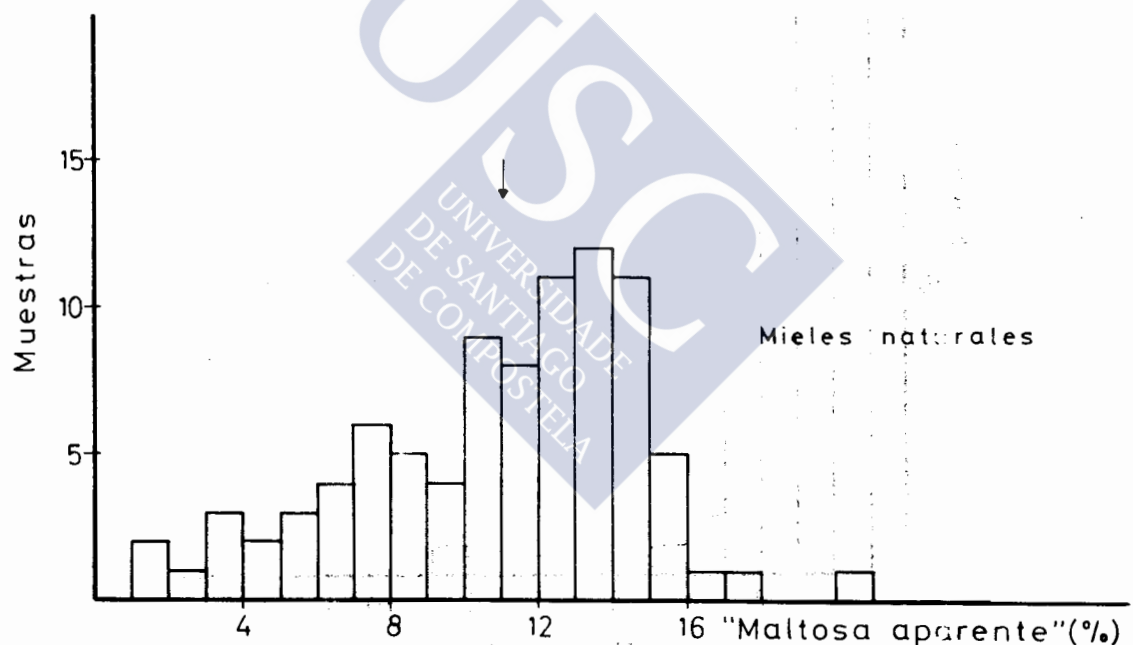
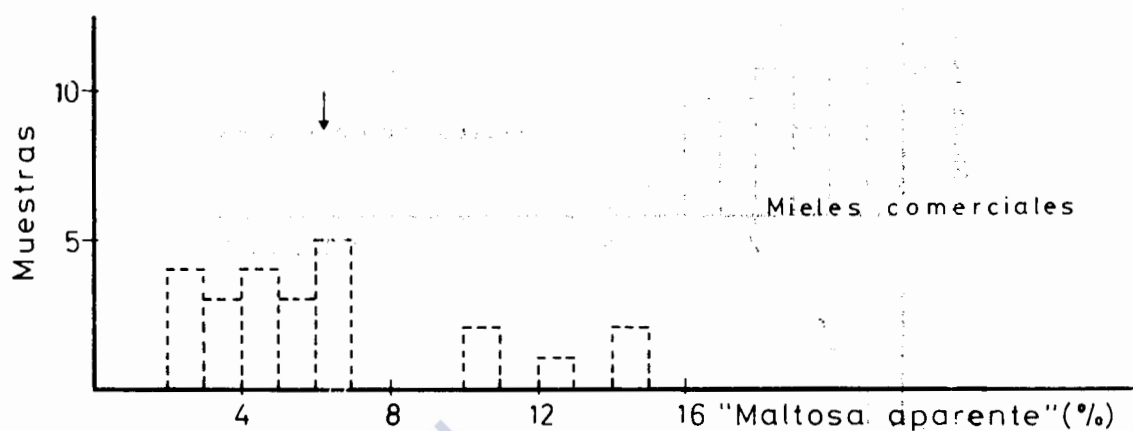


Figura 23

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en "maltosa aparente" (%). La flecha indica el valor promedio.

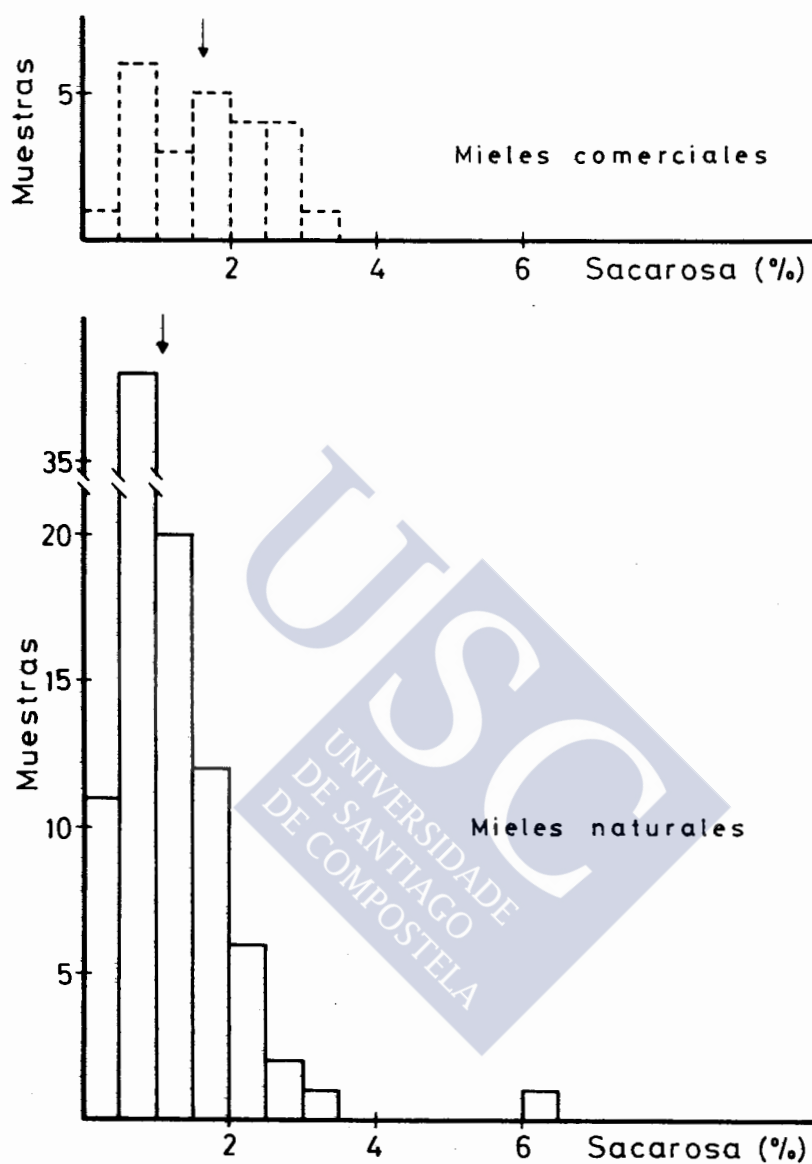


Figura 24

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en "sacarosa aparente" (%). La flecha indica el valor promedio.

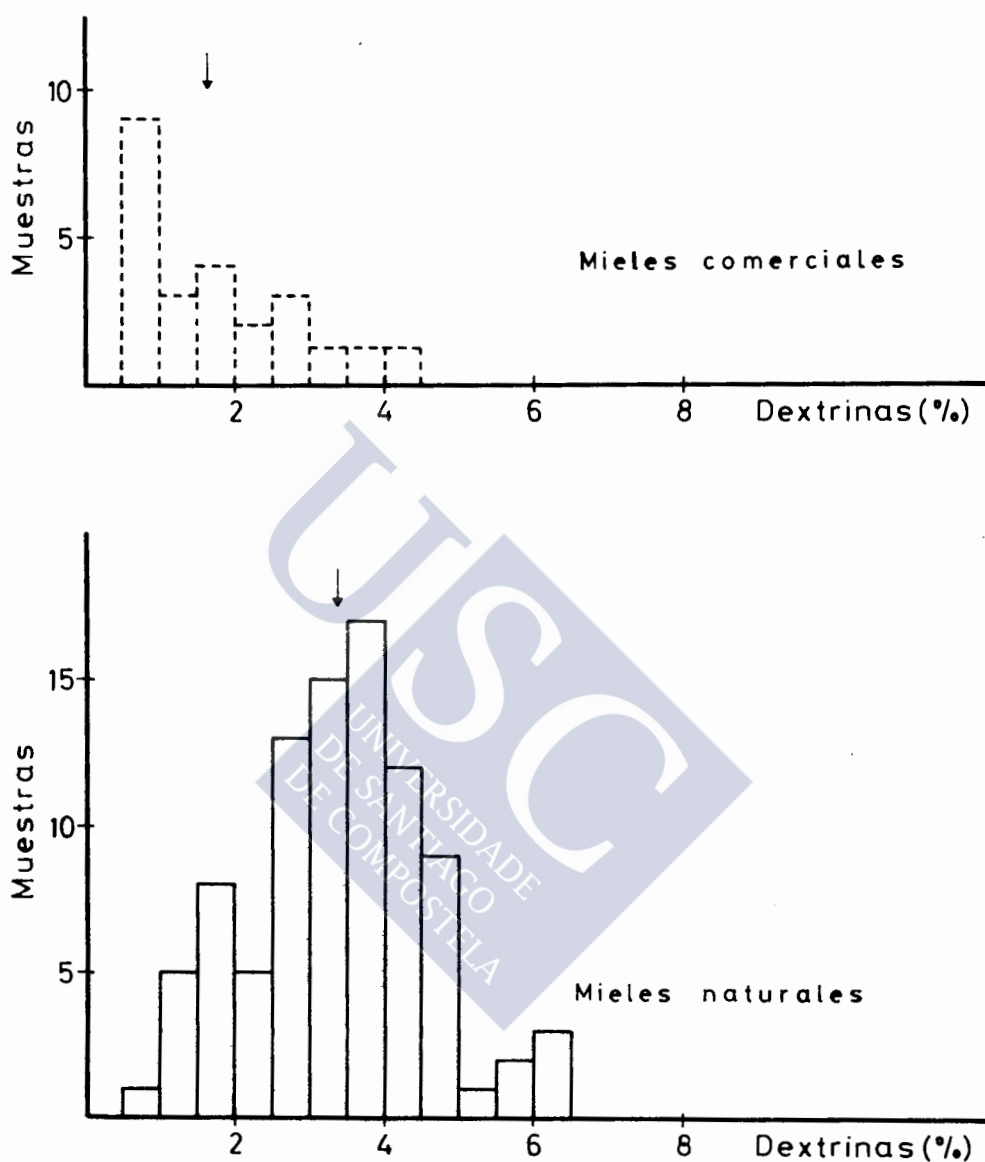


Figura 25

Distribución de los resultados encontrados para el contenido en dextrinas. La flecha indica el valor promedio.

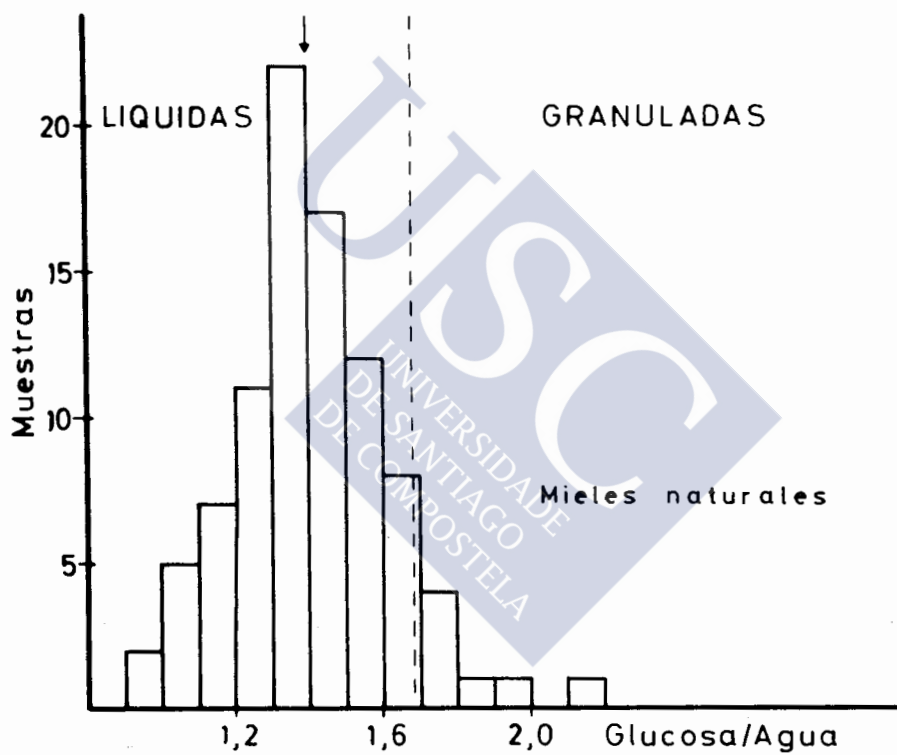
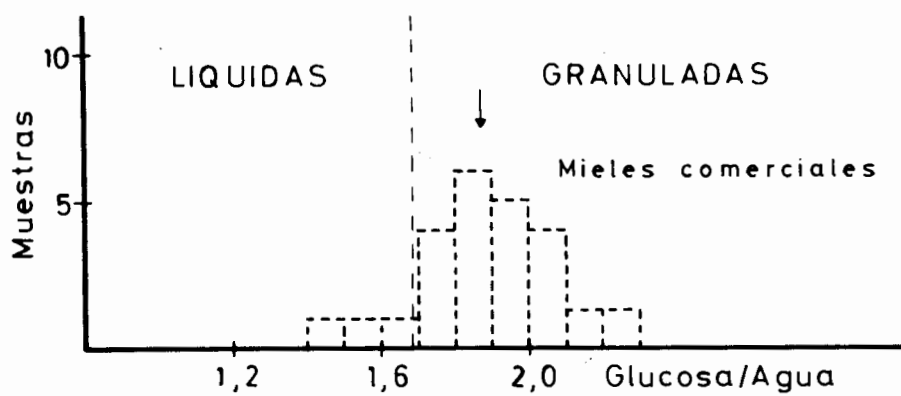


Figura 26

Distribución de los resultados encontrados para la relación glucosa/agua. La flecha indica el valor promedio. La línea discontinua vertical el valor discerniente de 1'7.

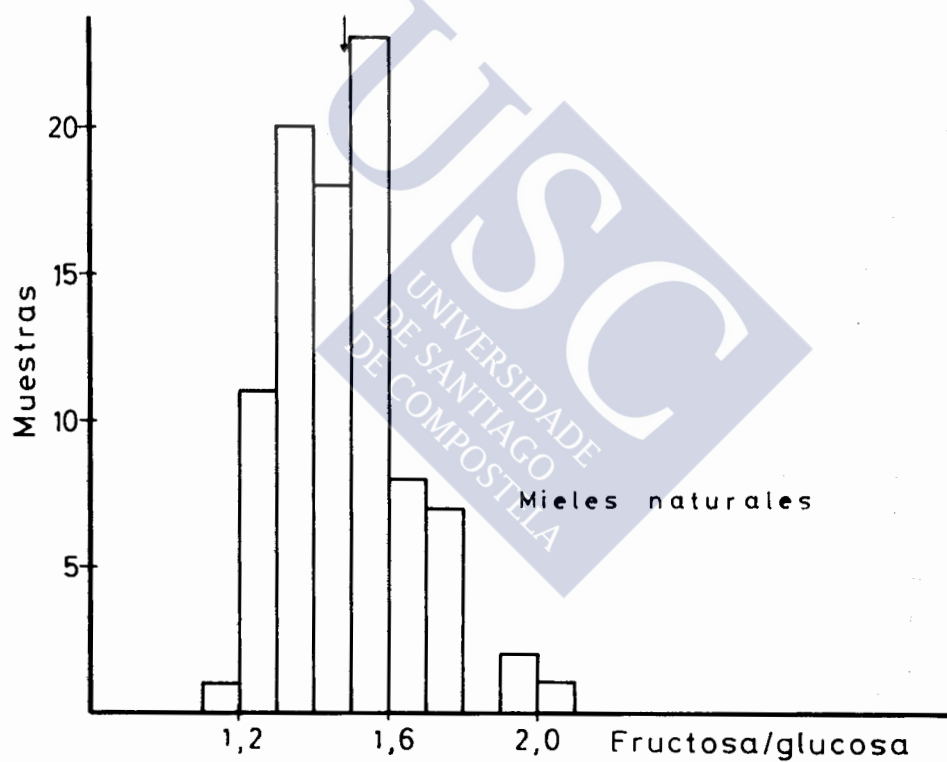
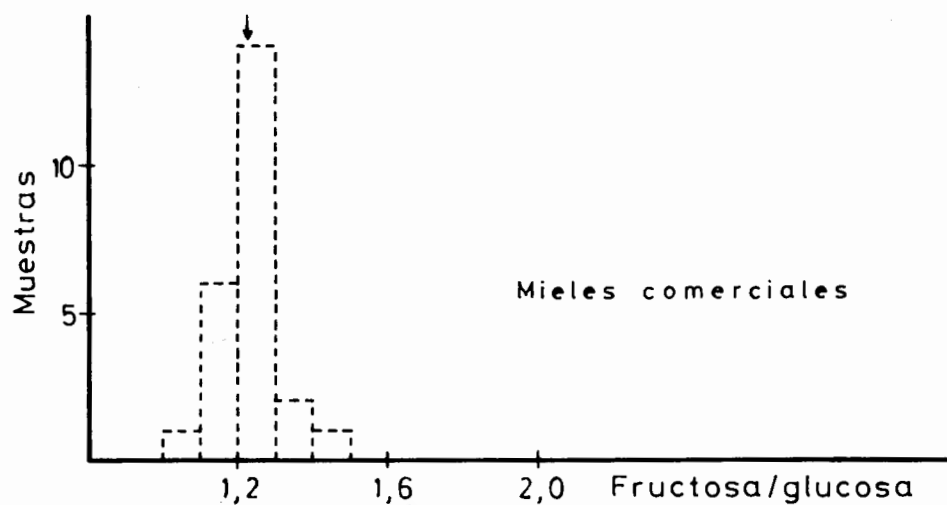
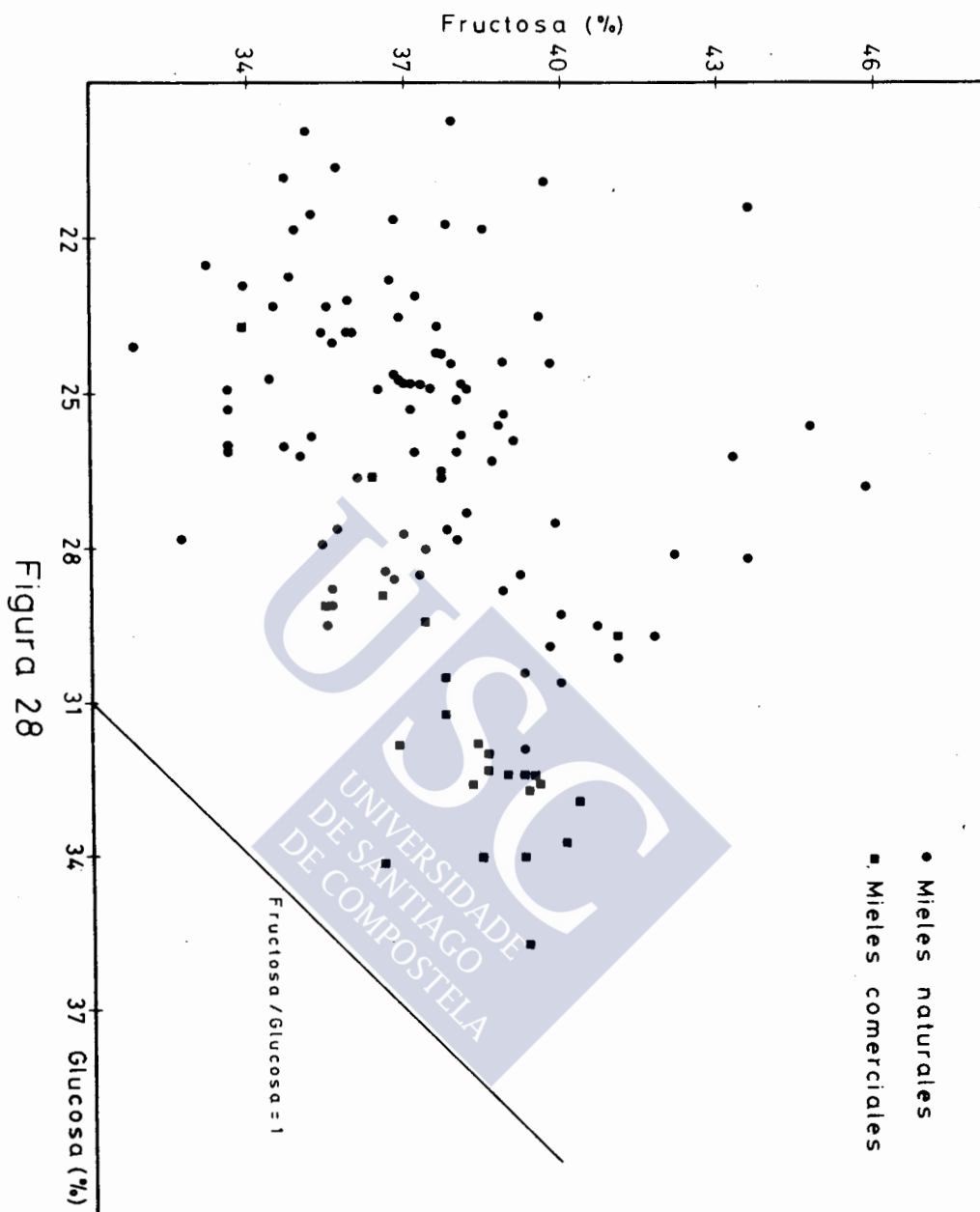


Figura 27

Distribución de los resultados para la relación fructosa/glucosa. La flecha indica el valor promedio.



Dispersión de la relación de monosacáridos en las muestras. La línea continua del gráfico indica la relación fructosa/glucosa = 1.

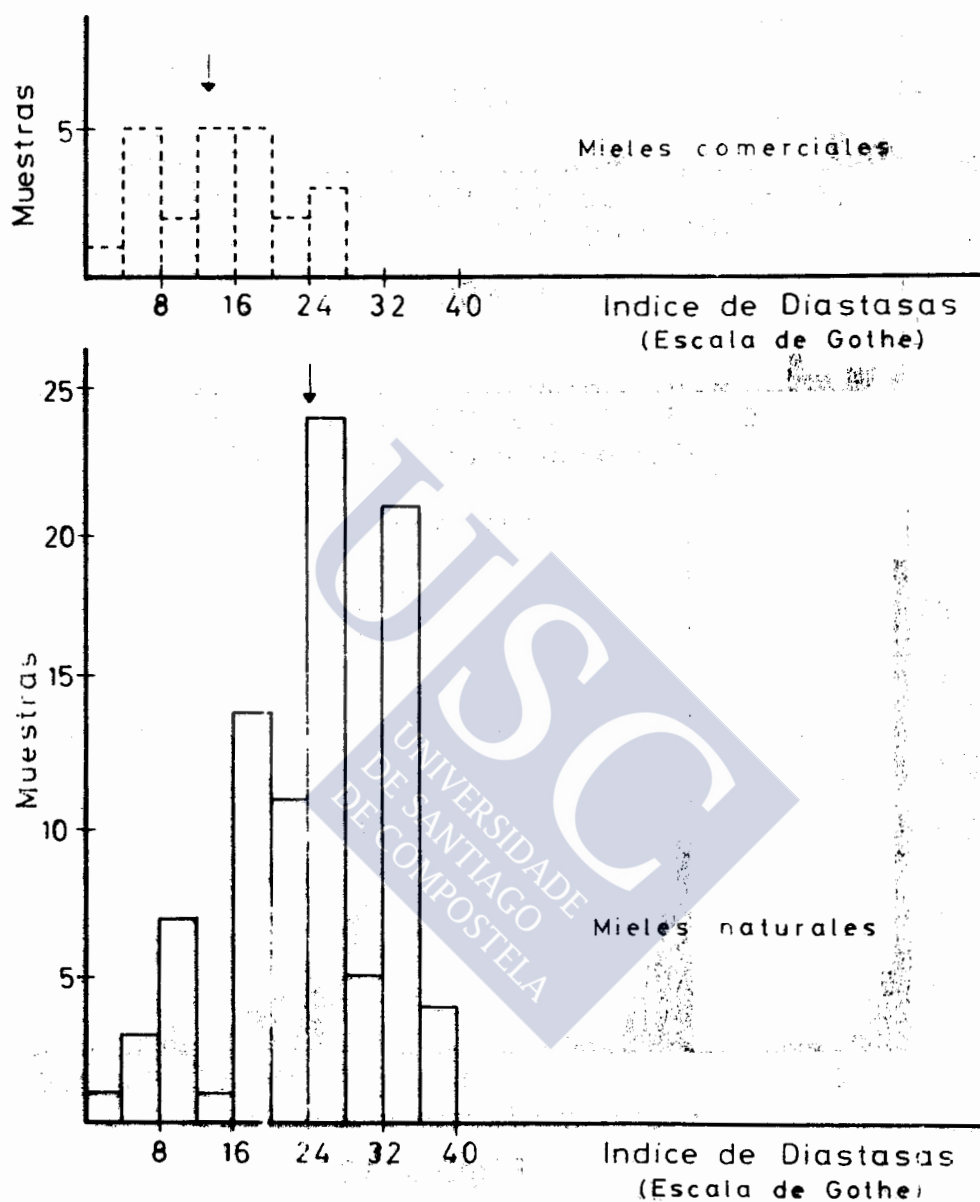


Figura 29

Distribución de los resultados encontrados para el índice de diastasas. La flecha indica el valor promedio.

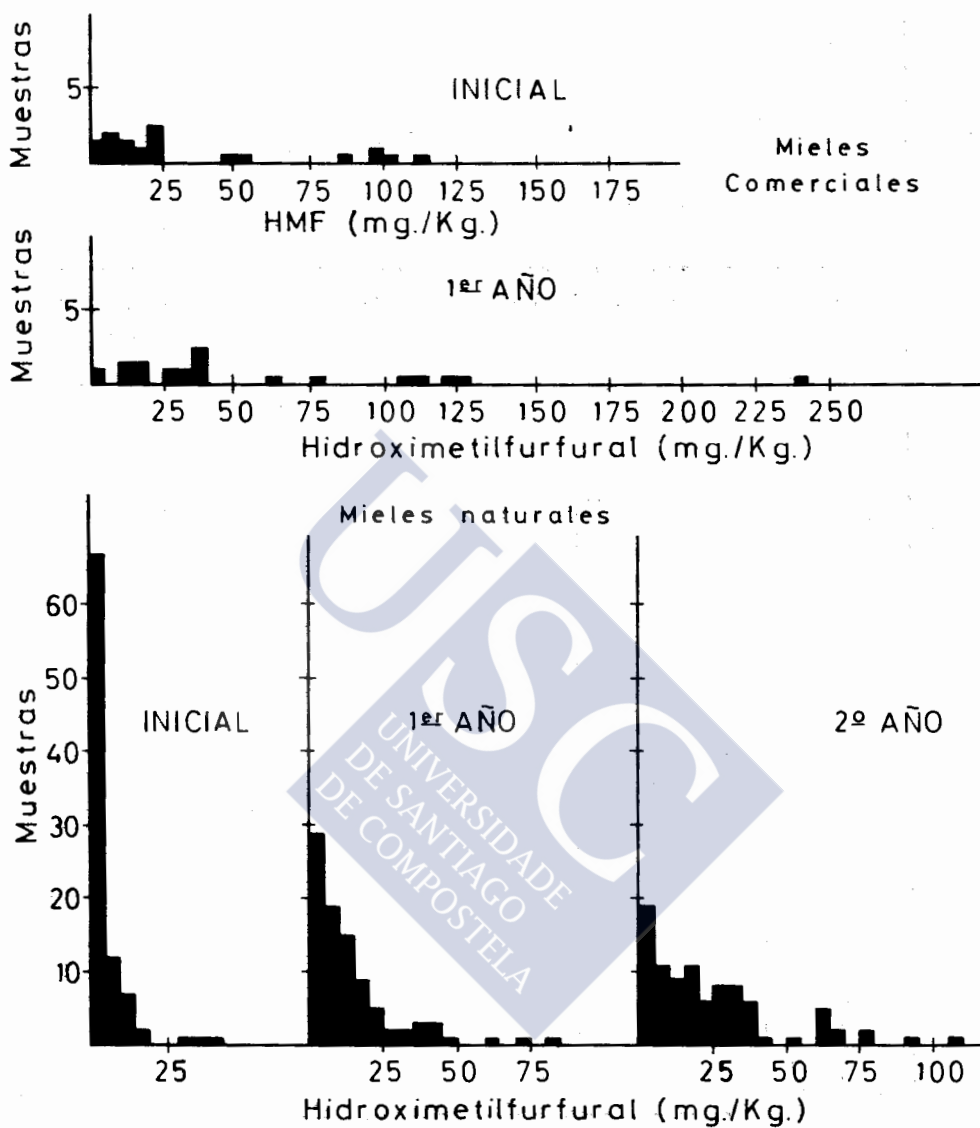


Figura 30

Distribución de la evolución de los resultados encontrados para el contenido de hidroximetilfurfural (meq./Kg) con el tiempo (años) durante su almacenamiento a la temperatura de laboratorio.

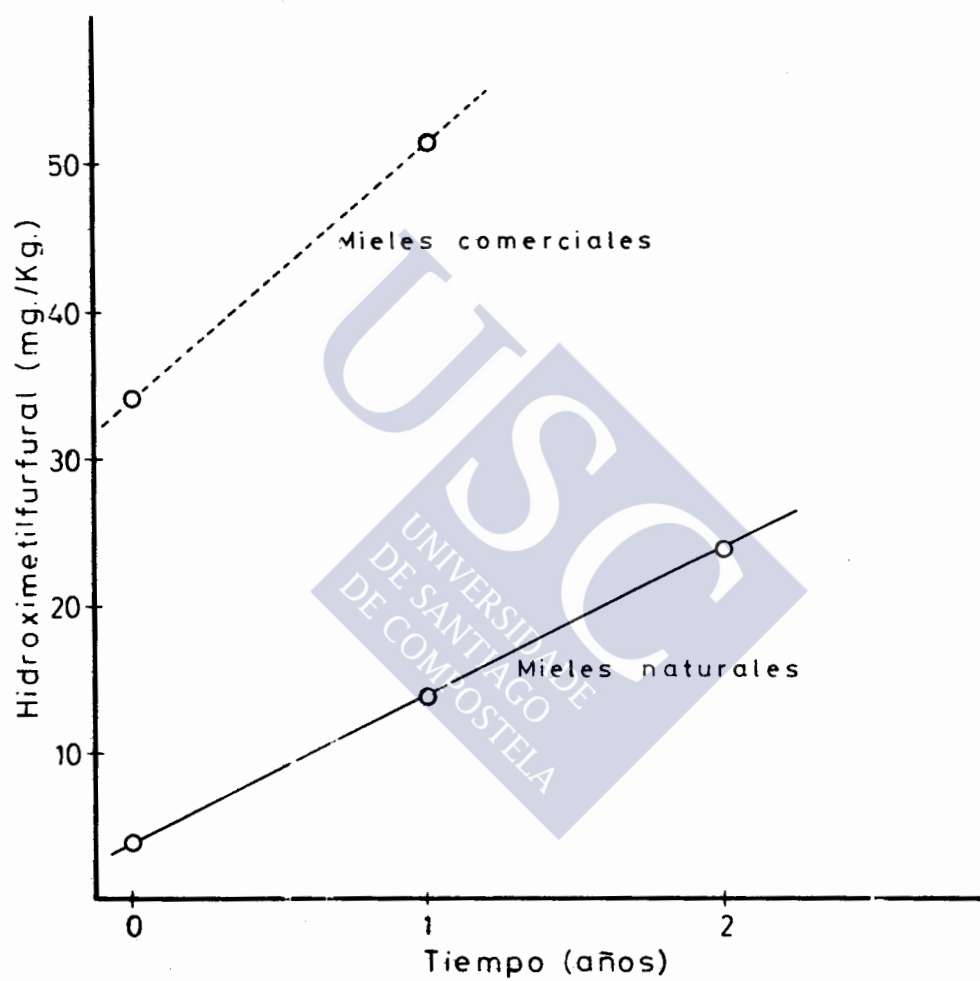


Figura 31

Representación gráfica de los valores promedios de hidroxi metilfurfural frente al tiempo durante su almacenamiento a la temperatura de laboratorio.



5.- CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

- 1.- Para la medida de color se proponen dos nuevos procedimientos. Uno, el que hace uso de las coordenadas tricromáticas de la "Commission Internationale de l'Eclairage" y otro original, más simple, que posibilita establecer la longitud de onda dominante a partir de la absorbancia neta ($A_{560\text{nm}} - A_{720\text{nm}}$) de la miel directamente en cubeta de 1 cm. También se comprueba que los métodos seguidos para la evaluación de color por la A.O.A.C. y el de Barbier y Valin adolecen de objetividad.
- 2.- La turbidez se establece espectrofotométricamente mediante la absorbancia a 720 nm. La equivalencia en grados "Cloudy" se estima por la ecuación de la recta de los valores obtenidos al leer en las mismas condiciones que en anterior parámetro los tres grados utilizados por la A.O.A.C.
- 3.- El pH, la acidez libre, la acidez láctica y la acidez total se determinan potenciométricamente siguiendo en parte nuestros métodos oficiales y los de la A.O.A.C., proponiendo además la medida del índice de formol que no figura, paradójicamente, en esta obra y en la "Norma sobre la miel".
- 4.- Para la determinación de cenizas se comprueba que es satisfactorio el método de incineración directa que incluye la A.O.A.C. en sus métodos oficiales previa desecación bajo radiaciones infrarrojas para evitar el rebosamiento.
- 5.- La medida del contenido en agua se realiza por el método de Karl Fischer mediante aplicación directa de la miel ya que el método es preciso y sus resultados no muestran diferencias significativas con el de desecación a vacío siendo aquel más rápido y sencillo. El método basado en la medida del índice de

refracción que es "oficial" entre nosotros y en la A.O.A.C. adolece de especificidad y en consecuencia de exactitud.

- 6.- En la valoración de azúcares se sugieren algunas modificaciones a los métodos tradicionalmente empleados en este alimento. Los contenidos en azúcar reductor y sacarosa se determinan siguiendo los métodos oficiales entre nosotros y en la A.O.A.C. Las cantidades de glucosa y fructosa se evalúan específicamente mediante métodos enzimáticos. Se propone el cálculo de la maltosa aparente por diferencia entre el poder reductor total y el correspondiente a la glucosa y fructosa, expresados ambos en azúcar invertido. En la valoración de dextrinas se sigue el método descrito en la A.O.A.C. que resulta más coherente que el incluido en nuestra "Norma sobre la miel".
- 7.- La evaluación del índice de diastasa se mejora mediante la regresión de los valores de absorbancia frente al tiempo, pudiendo acortarse en muchos casos la medida.
- 8.- Se demuestra que el método de Winkler para la determinación de hidroximetilfurfural en la miel, oficial en España, carece de precisión y exactitud y se comprueba la validez del método de White (Official First Action en la A.O.A.C.).
- 9.- De los resultados encontrados en las mieles comerciales podemos destacar, en general: Un color, turbidez, pH, acidez libre, acidez láctica, acidez total, índice de formol, cenizas, contenido en agua y azúcares propios a los atribuidos en la Bibliografía a las mieles florales al igual que la relación fructosa/glucosa siendo también normales por lo que respecta a los contenidos en maltosa, sacarosa y dextrinas. Los valores de la relación glucosa/agua son superiores a 1'7 lo que hace que estas mieles sean susceptibles de granulación y así ocurre, en efecto, en 21 de las 24 muestras analizadas cuya relación

supera aquel valor. Por lo que respecta al índice de diastasa se observa que 6 muestras no superan el mínimo exigido que es de 8. Igualmente para las mismas muestras el contenido de hidroximetilfurfural sobrepasa el límite legal (40 mg/Kg) lo cual pone de manifiesto una incorrecta manipulación.

10.- Las mieles naturales poseen un color, turbidez, pH, acidez libre, acidez láctica, acidez total, índice de formol, cenizas, contenido en agua y azúcares que confirman, en general, tratarse en su mayor parte de mieles de mielada o mezclas de miel de mielada y miel de flores pues además presentan un alto contenido en dextrinas y maltosa y bajo en glucosa y azúcares reductores totales; y la relación fructosa/glucosa se encuentra dentro del intervalo atribuido a las mieles de mielada. En general, tienen una baja tendencia a la granulación ya que su relación glucosa/agua es inferior a 1'7 en 86 de las 91 muestras. El índice de diastasa (excepto para los números 2, 5, 6 y 57) y el valor de hidroximetilfurfural (menos en la muestra 57) se encuentran dentro de los límites legales. También se ha comprobado que el hidroximetilfurfural se incrementa menos durante el almacenamiento en las mieles naturales que en las comerciales y esta circunstancia la atribuimos al pH más alto de aquellas.

11.- Por último, como resumen, queremos proponer la modificación de la "Norma sobre la miel" en los siguientes aspectos:

a) Definición

En el sentido de que no es una sustancia sino un producto de extraordinaria complejidad y que debiera mencionarse las especies productoras (*Apis mellifica*, L., y otras especies) como distingue el Código Alimentario Español (1967).

b) Características

En la composición de todas las mieles entran a formar parte, en mayor o menos porcentaje, sacarosa, maltosa, melecitosa, otros oligosacáridos y dextrinas.

c) Criterios de composición

Ampliar el término "Calluna" con el de Erica y otros para designar a las mieles de brezo.

Tener en cuenta las relaciones glucosa/agua y fructosa/glucosa, y modificar el actual valor máximo de contenido aparente en sacarosa para las mieles de mielada y mezclas de miel de mielada y miel de flores reservándola a las tres fuentes florales (Robinia, Lavandula y Banksia) en las que puede ser normal, fijándolo en un 5% para las demás.

Cambiar el de sustancias minerales por el de cenizas y asignar un valor inferior más correcto para las mieles de mielada y sus mezclas.

Distinguir entre los distintos tipos de acidez y su relación según el origen, dado que en este trabajo se observa que muchas de las muestras clasificadas como mieles de mielada presentan un valor de acidez libre alto y la relación acidez láctica/acidez libre se aproxima más al valor promedio de 0'127 establecido por White (1978) para estas mieles.

Incluir la turbidez y el índice de formol como parámetros a tener en cuenta.

d) Métodos de análisis

Introducir los métodos que permitan la evaluación de color, turbidez, índice de formol, glucosa, fructosa y maltosa aparente a fin de juzgar mejor su origen y calidad.

Modificar la determinación de la acidez por un método potenciométrico haciendo distinción entre sus tipos, rehacer el procedimiento de análisis cuantitativo aproximado de dextrinas que no está claro y acortar, en muchos casos, el cálculo del índice de diastasa en cuanto que la lectura a los cinco minutos

da una idea de dicha actividad.

Substituir los métodos actualmente empleados para establecer el contenido en agua y el valor de hidroximetilfurfural por los procedimientos de Karl Fischer y el de White, respectivamente.





6.- REFERENCIAS





REFERENCIAS

- Association of Official Analytical Chemists. 1970. Official Methods of Analysis. 11ª ed., Benjamin Franklin Station. Washington D.C. 20044. U.S.A.
- Association of Official Analytical Chemists. 1975. Official Methods of Analysis. 12ª ed., Benjamin Franklin Station. Washington D.C. 20044. U.S.A.
- Association of Official Analytical Chemists. 1978. Changes in Methods: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61 (2), 468.
- Association of Official Analytical Chemists. 1980. Official Methods of Analysis. 13ª ed., Benjamin Franklin Station. Washington D.C. 20044. U.S.A.
- Association of Official Analytical Chemists. 1980. Changes in methods. J. Asso. Off. Anal. Chem., 63 (2), 397.
- Association of Official Analytical Chemists. 1982. Changes in methods. J. Asso. Off. Anal. Chem., 65 (2), 31A01.
- Averbach, F. y Bolandier, E. 1924. Z. Unternch Narh. Gernsmittel, 4.
- Barbier, E.C. y Valin, J. 1957. Annales Falsifications et Fraudes, 400-411.
- Bayona Sánchez, J. 1956. El Farmacéutico Titular. Ed. Estades. Madrid.
- Boehringer-Mannhein. 1975. Análisis enzimático de Alimentos. 1ª ed. Barcelona.
- Boletín Oficial del Estado. 1967. Decreto 2484 de 21 de Septiembre. (Boletines de 17, 18, 19, 20, 21 y 23 de Octubre). Madrid.

- Boletín Oficial del Estado. 1975. Decreto 337 de 7 de Marzo. (Boletín del 11 de Marzo) "Norma sobre la Miel". Madrid.
- Boletín Oficial del Estado. 1976. Decreto 1771 de 2 de Julio. (Boletín de 28 de Julio). Madrid.
- Boletín Oficial del Estado. 1981. Decreto 246 de 17 de Septiembre. (Boletín del 14 de Octubre). Métodos Oficiales de Análisis de Vinos. La Medida de color en Vinos. Madrid.
- Brannsdorf, K. 1932. Annales Falsifications et Fraudes. 482.
- Braverman, J.B.S. 1963. Introduction to the Biochemistry of Foods. Elservier Publishing Company, 78. Amsterdam, London y New York.
- Brice, B.A., Turner, A.Jr. y White, J.W.Jr. 1956. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 39 (4), 919.
- Browne, C.A. 1908. U.S. Dep. Agric. Bur. Chem. Bull. 110, 1-93.
- Burgett, D.W. 1974. Ann. Entomol. Soc. Am. 67 (4), 545-547.
- Casares Gil, J. y Casares López, R. 1954. Tratado de Análisis Químico. Tomo III. 6ª ed. Ed. Estades. Madrid
- Casares López, R. 1967. Tratado de Análisis Químico. Tomo III. 8ª ed. Ed. Casares. Madrid.
- CERES. 1980. Revista F.A.O. sobre Agricultura y Desarrollo. 13 (6), 7. Roma.
- Comenge, M. 1964. Análisis de Alimentos. Tomo III. 3ª ed. Ed. Escelicer, S.A. Madrid.
- Davies, A.M.C. 1976. J. Food Technol. 11, 515-523.

- Dhar, A.K. y Roy, B.R. 1972. *Analyst*. 97, 681-685 (I).
- Doner, L.W., White, J.W.Jr. y Phillips, J. 1979. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62 (1), 186-189.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. *Analytical Chemistry*. 28 (1), 350-356.
- Duisberg, H. 1967. *Handbuch der Lebensmittelchemie*. V/1. Ed. Springer-Verlag. Berlín.
- Etheam, J. y Funderburk, C. 1977. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60 (4), 838-841.
- Esteban Quilez, M.A. y Marcos Barrado, A. *Anales de Bromatología*. Tomo XXVIII (1), 36. Madrid.
- F.A.O. 1955. *Tablas de Composición de Alimentos*. Roma.
- Farmacopea Oficial Española. 1954. 9ª ed. Ed. Estados. Madrid.
- Fiehe, J. y Kordotzki, W. 1928. *Annales Falsifications et Fraudes*. 289.
- Fiehe, J. 1929. *Annales Falsifications et Fraudes*. 172.
- Font-Quert, P. 1962. *Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado*. Ed. Labor, S.A. Barcelona.
- Gautier, J.A., Renault, J. y Álvarez, J. 1961. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 174, 253 y 397.
- Geigy. 1975. *Tablas Científicas*. 7ª ed. Ed. Sadagcolor. Barcelona.
- Gontarski, H. 1954. *Annales Falsifications et Fraudes*. 373.
- Günther, F. y Burckhart, O. 1967. *Dtsch. Lebensmitt Rdsch* 63 (2), 41-44.

- Hadorn, H. 1961. Trav. Chim. Alim. 52, 67.
- Hadorn, H. y Kovacs, A.J. 1980. Mitt. Gob. Lebensmittelunters, Hyg. 51, 373-398.
- Hadorn, H. y Zürcher, K. 1962. Mitt. Gob. Lebensmittelunters, Hyg. 53, 6-28.
- Hadorn, H. y Zürcher, K. 1966. Dtsch. Lebensmitt Rdsch. 62 (7), 195-201.
- Hart, F.L. y Fisher, H.J. 1977. Análisis moderno de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- I.N.C.A.P.-I.C.N.N.D. Reimpresión 1970. Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina. Ed. Interamericana, S.A. México.
- Jerez, R. 1963. Técnicas Bromatológicas para Farmacéuticos Titulares. Ed. Diana. Madrid.
- Jeuring, H.J. y Koppers, F.J.E.M. 1980. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (6), 7.
- Klein, B., Foreman, J.A. y Searcy, R.L. 1969. Analytical Biochemistry. 31, 412-425.
- Kling, M.A. 1922. Análisis de Alimentos. Tomo IV. Ed. Dunod. París.
- Kushnir, I. 1979. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (4), 917-920.
- Lampitt, L.H., Hugues, E.B. y Rooke, H.S. 1931. Annales Falsifications et Fraudes. 40-41.
- Leach, A.E. y Winton, A.L. 1909. Food Inspection and Analysis. 4ª ed. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. U.S.A.

- Lees, R. 1968. The Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis. Leonard Hill Books. London.
- Manuel Suisse des Denrées Alimentaires. 1974. Office Central Fédéral des Imprimés et du Matériel. 23. Berna.
- Matheu, G. 1938. Annales Falsifications et Fraudes. 400-411.
- McGregor, S.E. 1979. La apicultura en los Estados Unidos. Limusa. México.
- Melchor Biri, J.M. y Alemany Albert. 1976. Cría moderna de las abejas. Manual práctico. Ed. de Vecchi, S.A. Barcelona.
- Miralbés Bedera, R., Torres Luna, M.P. y Rodríguez Martínez-Conde, R. 1979. Mapa de límites de las parroquias de Galicia. Departamento de Geografía. Universidad de Santiago de Compostela.
- Montes, A.L. 1966. Bromatología. Tomo II. Ed. Universitaria. Buenos Aires.
- Montes, A.L. 1981. Bromatología. Tomo II. Ed. Universitaria. Buenos Aires.
- Moreno Martín, F. y Torre Boronat, M.C. 1979. Lecciones de Bromatología. Tomo I. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- Moreaux, B. 1936. Annales Falsifications et Fraudes. 22.
- Nahmias, F. 1980. La miel cura y sana. Ed. Vecchi. Barcelona.
- Nelson, E.K. y Mottern, H.H. 1931. Annales Falsifications et Fraudes. 297.
- Nueva Enciclopedia Larousse. 1981. Tomo 14. Ed. Planeta. Barcelona. Madrid.

- Pearson, D. 1962. The Chemical Analysis of Foods. 5ª ed. Ed. Churchill Ltd. London.
- Piette, A.M. 1965. Annales Falsifications et Fraudes. 40.
- Pigman, W.W. y Goepp, M.Jr. 1948. Chemistry of the Carbohydrates. Academic Press. New York.
- Ramsey, R.J. y Miliun, J.G. 1933. Am. Bee. J. 73, 305-306.
- Rivera, M.D. 1964. Anales de Bromatología. Tomo XVI. 59. Madrid.
- Rodier, J. 1966. Análisis químico y físico-químico de las aguas. Ed. Dunod. París.
- Root, A.I. 1976. ABC y XYZ de la apicultura. 10ª ed. Ed. Librería Hachette, S.A. Buenos Aires.
- Rudolph, P. y Barsch, H. 1932. Annales Falsifications et Fraudes. 432.
- Salazar Hidalgo, E. 1947. Sustancias alimenticias. Guía práctica de Análisis. 2ª ed. Ed. Dossat, S.A. San Sebastián.
- Sanz Pérez, B. y Triguero Rodríguez, A. 1970. Anales de Bromatología. Tomo XXII. 377-406. Madrid.
- Secchi, G. 1967. I Nostri Alimenti. Ed. Ulrico Hoepli. Milán. Italia.
- Schade, J.E., Marsh, G.L. y Eckert, J.E. 1958. Food Research. 23, 446.
- Schuetz, H.A. y Remy, K. 1932. Annales Falsifications et Fruades. 481.
- Siegenthaler, V. 1975. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 64, (4), 393-399.

- Siegenthaler, V. 1977. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 68, (2), 251-258.
- Simal, J., Huidobro, J.F. y Araquistain, J.L. 1981. Estudio de parámetros de calidad de mieles comerciales. Tesina. Facultad de Farmacia. Santiago de Compostela.
- Stinson, E.E., Subers, M.H., Petty, J. y White, J.W.Jr. 1960. Arch. Biochem. Biophys. 89, 6-12.
- Susumu Honda, Yoshikasu Matsuda, Masaye Takahashi y Kazuaki Kakehi. 1980. Analytical Chemistry. 52, 1079-1082.
- Talpay, B. 1977. Dtsch. Lebensmitt. Rdsch. 73 (4), 129.
- Taveira, M. y Bethlem, M.L.B. 1958. Química Bromatológica. Fascículo III. Facultad de Farmacia de la Universidad de Brasil.
- Taylor, W.H. 1957. Analyst. Vol. 82, 488.
- Tong, S.S.C., Morse, R.A., Bache, C.A. y Lisk, D.J. 1975. Arch. Environ Health. 30 (7), 329-333.
- Valenciano, O.A. 1954. Guía Práctica de Análisis Bromatológicos. Tomo IV. Ed. Hispano-Americana, S.A. Buenos Aires.
- Villavechia, V. 1944. Tratado de química analítica aplicada. Tomo II. 184-185. Ed. Gustavo Gili, S.A. Barcelona.
- Weis, F. 1930. Annales Falsifications et Fraudes. 615.
- White, J.W.Jr., Riethof, M.L. y Kushnir, I. 1961. J. Food Sci. 26 (1), 63-71.
- White, J.W.Jr. 1962. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 45, 548-551.

- White, J.W.Jr., Riethof, M.L., Subers, M.H. y Kushnir, I. 1962. U.S. Dep. Agric. Technol. Bull. 1261, 1-124.
- White, J.W.Jr., Kushnir, I. y Subers, M.H. 1964. Food Technol. 18 (4), 153-156.
- White, J.W.Jr. 1977. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, (3), 669-672.
- White, J.W.Jr. 1978. Advances in Food Research. 24, 287-374. Ed. Board. Academic Press. New York. San Francisco. London.
- White, J.W.Jr. y Dower, L.W. 1978. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 61 (3), 746-750.
- White, J.W.Jr. 1979a. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (3), 515-526.
- White, J.W.Jr. 1979b. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (3), 509-514.
- White, J.W.Jr., Kushnir, I. y Doner, L.W. 1979. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62 (4), 921-927.
- White, J.W.Jr. y Siciliano, J. 1980. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (1), 7-10.
- White, J.W.Jr. 1980. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (1), 11-18.
- Winkler, O. 1956. Annales Falsifications et Fraudes. 23.